

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FARMACOLOGIA
LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA DO
COMPORTAMENTO**

Karolina Domingues

**Influência do dimorfismo sexual na resposta ao tratamento
com Fluoxetina em ratos no nado forçado repetido: contribuição do
metabolismo da serotonina**

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Domingues, Karolina

Influência do dimorfismo sexual na resposta ao
tratamento com Fluoxetina em ratos no nado forçado
repetido: contribuição do metabolismo da serotonina /
Karolina Domingues ; orientadora, Cilene Lino de Oliveira -
Florianópolis, SC, 2015.
88 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. fluoxetina. 3. antidepressivo. 4.
diferenças sexuais. 5. teste do nado forçado. I. Lino de
Oliveira, Cilene. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III.
Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FARMACOLOGIA
LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA DO
COMPORTAMENTO**

Karolina Domingues

**Influência do dimorfismo sexual na resposta ao tratamento
com Fluoxetina em ratos no nado forçado repetido: contribuição do
metabolismo da serotonina**

Dissertação submetida ao
Programa de pós-graduação em
farmacologia da Universidade
Federal de Santa Catarina para
obtenção do grau de mestre em
Farmacologia.

Orientadora: Prof. Dra.
Cilene Lino de Oliveira

Florianópolis
2015

Dedico este trabalho à minha família

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, primeiramente, às agências de financiamento CAPES e CNPq, e à minha orientadora, Dra. Cilene Lino de Oliveira pela confiança e direcionamento.

Agradeço imensamente também ao Prof. Dr. Anicleto Poli pela contribuição indispensável nas quantificações por CLAE. Prof. Dr. José Marino Neto pelo apoio e confiança. Prof. Dra. Áurea Elizabeth Linder pela ajuda na realização dos ensaios de racaptação. Renata Marchette pela ajuda com o Western Blot.

Agradeço também às IC's Inaê e Laís, personagens indispensáveis no desenvolvimento deste trabalho, e também aos colegas de laboratório Janine, Patrick e Tati pela ajuda sempre presente.

Agradeço a todos os meus amigos e amigas por perguntarem sobre meu trabalho, e achá-lo interessante, mesmo sem entender nada!

À minha família por todo o apoio dado nos momentos difíceis.

E, finalmente, ao Fernando Falkenburger Melleu, que não só contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho, como também me ajudou a manter a sanidade nos períodos de oscilações hormonais.

“Little by little, one travels far”
- J. R. R. Tolkien

Resumo

Diferenças sexuais são descritas na resposta a antidepressivos no teste do nado forçado, em ratos. O teste do nado forçado repetido (TNF-r) avalia os efeitos agudos e crônicos do tratamento com antidepressivos no mesmo grupo de animais. O TNF-r consiste de uma sessão de nado de 15 minutos (pré-teste) seguida de sessões de 5 minutos no primeiro (teste), sétimo (reteste 1) e décimo quarto (reteste 2) dias após o pré-teste. Em ratos machos, a repetição induz um aumento do tempo de imobilidade. Este efeito é contraposto pelo tratamento com antidepressivos. O objetivo deste estudo foi comparar os efeitos do tratamento com fluoxetina (FLX) em ratos machos e fêmeas expostos ao TNF-r. Para tal, ratos machos e fêmeas foram treinados a ingerir uma solução de sacarose 10% por 7 dias. Após este período, os grupos foram designados. Os machos receberam sacarose 10% (vei) ou FLX 2,5mg/Kg. As fêmeas receberam vei, FLX 1mg/Kg, FLX 2,5mg/Kg ou FLX 5mg/Kg. O tratamento teve duração de 14 dias. A repetição do teste falhou em aumentar significativamente o tempo de imobilidade nos machos, e também, em fêmeas. Estes efeitos podem ser atribuídos as propriedades apetitivas da sacarose. O tempo de imobilidade nas fêmeas também não foi afetado pela repe. O tratamento crônico com FLX reduziu o tempo de imobilidade nos machos, mas não nas fêmeas. Considerando estes resultados, sugerimos que poderia existir um dimorfismo sexual no sistema serotoninérgico destes animais. Para investigar essa hipótese, os animais foram decapitados sob anestesia e regiões do encéfalo foram dissecadas. Estas regiões foram incubadas *in vitro* com veículo ou serotonina (5-HT) e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção eletroquímica. Encontramos que, no hipocampo, as concentrações de 5-HT e 5-HIAA são semelhantes em ambos os sexos. No entanto, no córtex, as fêmeas apresentam uma concentração de 5-HT muito menor do que os machos. Porém, a concentração de 5-HIAA foi semelhante. Como o tratamento com FLX reduziu os níveis intracelular de 5-HT no hipocampo, tanto de machos quanto de fêmeas, podemos sugerir que a FLX inibiu o transportador de 5-HT (SERT). Já que a incubação *in vitro* com 5-HT dos tecidos dos animais tratados com FLX aumentou as concentrações de 5-HT igualmente para machos e fêmeas, concluímos que o sistema cortical serotoninérgico das fêmeas funciona do mesmo modo que o dos machos, porém, com quantidades reduzidas de 5-HT.

Palavras chave: fêmeas, fluoxetina, diferenças sexuais, teste do nado forçado repetido.

Abstract

Sex differences are reported in the response to antidepressants in the forced swimming test. The repeated forced swimming test is planned to evaluate the acute and chronic effect of antidepressant treatment in the same group of rats. Repeated FST consists of 15 min of swimming (pretest) followed by 5 min of swimming in the first (test), seventh (retest 1) and fourteenth (retest 2) day after pretest. In male rats, the repetition induces an increase in the immobility time. This effect is counteracted by antidepressant treatment. The aim of this study was to compare the effects of fluoxetine (FLX) in male and female rats exposed to the repeated FST. For that, male and female rats were trained to ingest a 10% sucrose solution for 7 days. After that, different groups were assigned. Males received either sucrose 10% (Veh) or FLX 2,5mg/Kg. Females received Veh, FLX 1mg/Kg, FLX 2,5mg/Kg or FLX 5mg/Kg. Surprisingly, the repetition of the test failed to significantly increase the immobility time in males, however, this effect can be due to the sucrose, since it is palatable to rodents. The immobility time in females was also not affected. The chronic treatment with FLX reduced the immobility time in males, but not in females. Considering this data, we hypothesized that could exist a sexual dimorphism in the serotonergic system of these animals. To investigate that, the animals were decapitated under anaesthesia and brain regions were dissected. These regions were either incubated *in vitro* with vehicle or serotonin (5-HT) and further analyzed by HPLC with electrochemical detection. We found that, in the hippocampus, 5-HT and 5-HIAA concentrations were similar in both sexes. However, in the cortex, females had a much lower 5-HT levels than the males. However, 5-HIAA concentration was similar. Since the treatment with FLX reduced 5-HT levels in the hippocampus of both male and female, we can assume that FLX was inhibiting the 5-HT transporter (SERT). Since *in vitro* incubation with 5-HT in the tissues of the animals treated with FLX increased the 5-HT concentrations equally in both male and female brain tissues, we can assume that the female cortical system works the same as males, but with a decreased concentration of 5-HT.

Palavras chave: female, fluoxetine, sex differences, rats, repeated forced swimming test.

Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema do desenho experimental.....	37
Figura 2 – Fotomicrografias do lavado vaginal.....	41
Figura 3 – Cortes sagitais das estruturas do encéfalo de rato, dissecadas para o ensaio de funcionalidade do SERT para o experimento comportamental.....	43
Figura 4 – Durações dos comportamentos dos ratos	52
Figura 5 – Durações dos comportamentos das ratas	53
Figura 6 – Durações dos comportamentos de ratos machos e fêmeas tratados com veículo.....	54
Figura 7 – Durações dos comportamentos de ratos machos e fêmeas tratados com FLX.....	55
Figura 8 – Concentrações de 5-HT e 5-HIAA basais no córtex de ratos machos e fêmeas.....	63
Figura 9 – Concentrações de 5-HT e 5-HIAA basais no hipocampo de ratos machos e fêmeas.....	64
Figura 10 – Concentrações de 5-HT e 5-HIAA em porcentagem do basal no córtex de ratos machos e fêmeas.....	65
Figura 11 – Concentrações de 5-HT e 5-HIAA em porcentagem do basal no hipocampo de ratos machos e fêmeas.....	66

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Resultados de estudos com ratas no teste do nado forçado.....	29
Tabela 2 - Durações dos comportamentos no TNF –r dos ratos machos e fêmeas no experimento piloto: efeitos dos fatores repetição e tratamento.	49
Tabela 3 - Frequência dos comportamentos no TNF –r dos ratos machos e fêmeas no experimento piloto: efeitos dos fatores repetição e tratamento.	50
Tabela 4 - Durações dos comportamentos dos ratos no TNF-r: efeitos dos fatores repetição e tratamento.	56
Tabela 5 - Frequências dos comportamentos dos ratos no TNF-r: efeitos dos fatores repetição e tratamento.	57
Tabela 6 - Durações dos comportamentos das ratas no TNF-r: efeitos dos fatores repetição e tratamento.	58
Tabela 7 - Frequências dos comportamentos das ratas no TNF-r: efeitos dos fatores repetição e tratamento.	59
Tabela 8 - Durações dos comportamentos de ratos machos e fêmeas no TNF-r: efeitos dos fatores repetição e sexo.....	60
Tabela 9 - Frequências dos comportamentos de ratos de machos e fêmeas controle no TNF-r: efeitos dos fatores repetição e sexo....	61
Tabela 10 - Concentrações de 5-HT e 5-HIAA e razão 5-HIAA/5-HT em diferentes regiões do cérebro de ratos machos e fêmeas para o experimento piloto.	67
Tabela 11 - Concentrações de 5-HT e 5-HIAA e razão 5-HIAA/5-HT em diferentes regiões do cérebro de ratos machos e fêmeas para o experimento 1.....	68
Tabela 12 - Correlação entre os comportamentos no reteste 2 com as concentrações cerebrais de 5-HT 5-HIAA de ratos.....	70
Tabela 13 - Correlação entre os comportamentos no reteste 2 com as concentrações cerebrais de 5-HT 5-HIAA de ratas.....	71

Lista de abreviaturas

5-HIAA – Ácido 5-hidróxindol acético
5-HT – Serotonina
AMT – Amitriptilina
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
CLP – Citalopram
CMI - Clormipramina
DLX – Duloxetina
DMI – Desipramina
FLX – Fluoxetina
FVX – Fluvoxamina
i.p – Intraperitoneal
IRNS – Inibidores da recaptação de noradrenalina e serotonina
ISRS – Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
MAO – Enzima monoaminas oxidase
OVX – ovariectomia
RBX – Reboxetina
SD – Sprague-dawley
SERT – Serotonin transporter (Transportador de serotonina)
SRT – Sertralina
TNF-r – Teste do nado forçado repetido
Vei – Veículo
VLX – Venlafaxina
W – Wistar

Sumário

1.Introdução.....	23
1.1.Antidepressivos	23
1.2.Modelos animais: Teste do nado forçado repetido (TNF-r).....	25
1.3.Teste do nado forçado repetido: relevância do sexo dos ratos.....	27
2.Objetivos	35
2.1.Objetivo Geral	35
2.2.Objetivos Específicos	35
3.Estratégia de Estudo e Desenho Experimental	37
4.Materiais e Métodos	39
4.1.Animais e condições de alojamento	39
4.2.Procedimentos para administração de substâncias por via oral: treinamento e administração por ingestão espontânea	39
4.3.Procedimentos de determinação do ciclo estral.....	40
4.4.Procedimentos do TNF-r	41
4.5.Avaliação da função dos transportadores de 5-HT no cérebro de ratos machos e fêmeas adultos jovens	42
4.6.Procedimentos para a CLAE com detecção eletroquímica	43
5.Análise Estatística.....	45
6.Resultados	47
6.1.Comportamento de ratos machos e fêmeas no TNF-r	47
6.1.1.Experimento Piloto.....	47
6.1.2.Experimento Comportamental	51
6.2.Metabolismo de 5-HT no cérebro de ratos machos e fêmeas	62
6.2.1.Experimento piloto:	62
6.2.2.Experimento Neuroquímico:	62
7.Discussão.	70

7.1.Os comportamentos dos ratos machos e fêmeas no TNF-r e a contribuição do dimorfismo sexual para as respostas comportamentais ao estresse. 73

7.2.Resposta comportamental de ratos machos e fêmeas ao tratamento com FLX: comparações com o teste de Porsolt.....73

7.3.Metabolismo de 5-HT no cérebro de ratos machos e fêmeas75

8.Conclusão.79

9.Referências81

1. Introdução

1.1. Antidepressivos

Os antidepressivos que são parte da terapêutica atual surgiram por observações clínicas de seus efeitos antes da década de 60 (NESTLER E HYMAN, 2010). A imipramina, por exemplo, foi sintetizada em 1948 e, por sua similaridade com a clorpromazina, foi testada na década de 50 como antipsicótico. Apesar do insucesso no tratamento desta patologia, Ronald Kuhn observou a melhora do humor nos pacientes esquizofrênicos com sintomas depressivos (GUIMARÃES, 2012; HILLHOUSE E PORTER, 2015).

A observação que os primeiros fármacos antidepressivos têm como principal alvo o sistema de monoaminas deu suporte então à hipótese monoaminérgica da depressão (SCHILDKRAUT E KETTY, 1967; DEAKIN E GRAEFF, 1991). A hipótese monoaminérgica (SCHILDKRAUT E KETTY, 1967) justifica o aparecimento da depressão como uma redução dos níveis encefálicos de monoaminas. Assim, os primeiros fármacos antidepressivos foram classificados de acordo com a forma que favoreciam a neurotransmissão monoaminérgica: inibidores da monoaminoxidase (MAO) e inibidores não seletivos da recaptação de monoaminas (SHELTON, 2003). Mais tarde surgiram os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS), e/ou noradrenalina ou dopamina (WONG *et al*, 1974). A teoria serotoninérgica (DEAKIN E GRAEFF, 1991) considera que o núcleo dorsal da rafe e o mediano da rafe regulam vias serotoninérgicas diferentes, que dependem de diferentes subtipos de receptores de serotonina (5-HT) e do tipo de estresse, e modulam diferentes transtornos afetivos.

Os fármacos antidepressivos monoaminérgicos são empregados no tratamento de vários transtornos do humor, ansiedade e dor (CARVILLE *et al*, 2008, SCHMITT *et al*, 2005). Com relação ao efeito antidepressivo destes fármacos em humanos, foi observado que todas as classes de antidepressivos mostram efeito quando comparadas ao placebo (LINDE *et al.*, 2015). Contudo, somente 1/3 dos pacientes tratados com os antidepressivos monoaminérgicos alcança a remissão dos sintomas depressivos (TRIVEDI *et al.*, 2006). Os ISRS têm sido os fármacos de primeira escolha para início de tratamento devido a sua baixa toxicidade e alta tolerabilidade (RUSH *et al*, 2006).

Os efeitos terapêuticos dos fármacos antidepressivos monoaminérgicos aparecem após o tratamento crônico. Essa demora no aparecimento do seu efeito se explica pela existência de muitos mecanismos que são afetados pelo tratamento continuado com a

substância (ANDREWS *et al*, 2015). Um dos mecanismos aparentemente responsáveis pela latência entre o início do tratamento e o aparecimento dos efeitos terapêuticos é o da regulação dos autorreceptores nos corpos celulares dos neurônios monoaminérgicos (HERVÁS E ARTIGAS, 1998, HONIG *et al*, 2009; SIESSER *et al*, 2012).

A serotonina é produto da conversão do aminoácido triptofano, captado da corrente sanguínea para dentro dos corpos neuronais serotoninérgicos. O triptofano passara então por uma cascata de síntese, onde a enzima característica de um neurônio serotoninérgico é a triptofano hidroxilase. Após sintetizada, a serotonina é vesiculada e está disponível para liberação na fenda sináptica. Após a liberação na fenda, a serotonina estará disponível para se ligar nos receptores serotoninérgicos, ou ser recaptada pelo transportador seletivo, o SERT. Após recaptada pelo transportador, a serotonina pode ser novamente revesiculada ou metabolizada pela enzima intracelular MAO, em ácido 5-hidróxiindolacético (5-HIAA) (HERVÁS E ARTIGAS. 1998; CHASE E MURPHY, 1973). Os receptores de serotonina constituem uma grande família de receptores com subtipos de 1 a 7, onde, com exceção do receptor 5HT₃, um canal iônico controlado por ligante, todos os outros são receptores acoplados à proteína G. Ainda dentro desta grande família temos o receptor pré-sináptico inibitório 5-HT_{1A}, que controla a liberação de 5-HT na fenda sináptica (CELADA E ARTIGAS, 1993; GUIMARÃES, 2012; REYNOLDS, GOWAN DALTON, 2014; ANTYP, SERRETI E RUJESCU, 2013; BAUER, 2015) .

Os autorreceptores nos corpos dos neurônios monoaminérgicos quando estimulados reduzem a síntese e liberação das monoaminas (HERVÁS E ARTIGAS, 1998, ZANOVELI *et al*, 2010). No início do tratamento com os antidepressivos as quantidades extracelulares de monoaminas aumentam, em decorrência da inibição da recaptação ou da inibição da atividade da MAO, ativando os autorreceptores regulatórios que então inibem a liberação e produção do neurotransmissor (CELADA; ARTIGAS, 1993, SIESSER *et al*, 2012). Como resultado deste mecanismo de retroalimentação negativa, não há aumento significativo dos níveis monoaminérgicos extracelulares logo após o tratamento agudo com os antidepressivos (CELADA E ARTIGAS, 1993, HERVÁS E ARTIGAS, 1998, SIESSER *et al*, 2012). Com o uso crônico destes fármacos, e a presença constante do neurotransmissor se ligando aos autorreceptores, ocorre dessensibilização dos autorreceptores que permitem então um aumento substancial nos níveis de monoaminas e a melhora dos sintomas depressivos (ARTIGAS; ADELL; CELADA, 2006; GAYNES *et al*, 2009).

Mais recentemente surgiu a hipótese de que o tratamento crônico com antidepressivos induziria um aumento da neurogênese hipocampal, ou seja, aumento do número de neurônios novos no hipocampo, e que isto também poderia estar relacionado com seus efeitos clínicos (MALBERG *et al*, 2000; WARNER-SCHMIDT E DUMAN, 2006). Outros mecanismos surgiram mais recentemente com a descoberta dos efeitos antidepressivos rápidos da Cetamina, um antagonista de receptor NMDA, sugerindo uma possível participação do sistema glutamatérgico na neurobiologia dos transtornos depressivos. (SCHEUING *et al*, 2015).

1.2. Modelos animais: Teste do nado forçado repetido (TNF-r)

Na pesquisa em psicofarmacologia, diversos modelos animais são comumente utilizados para avaliar o potencial terapêutico de novas moléculas. Os modelos animais para avaliar atividade antidepressiva se popularizaram na década de 70 (PORSOLT *et al*, 1977, 1978, 1979; SCHECHTER E CHANCE, 1979). O modelo animal ideal deveria ter pelo menos 3 tipos de validade: constructo ou homologia, face ou analogia e a preditiva ou farmacológica (WILLNER, 1997; NESTLER; HYMAN, 2010).

A validade de constructo é baseada na avaliação da capacidade do modelo de recriar no animal os processos etiológicos causadores da doença/transtorno em humanos. A validade de face é estimada avaliando-se a capacidade do modelo de mimetizar os sintomas e as características anatômicas, bioquímicas e patológicas em humanos com a doença/transtorno. A validade preditiva/farmacológica é atribuída aos modelos nos quais a resposta do animal ao tratamento prediz seu efeito em humanos com a doença/transtorno (NESTLER E HYMAN, 2010).

A dificuldade de criar modelos válidos de psicopatologias reside no fato que os sintomas dos transtornos de humor em humanos são subjetivos, como alucinações, delírios, tristeza e culpa, e impossíveis de serem observados nos animais (NESTLER E HYMAN, 2010). Apesar de ser possível recriar em animais alguns sintomas tais como comportamento social anormal, anedonia e falta de memória, ainda assim são somente aproximações grosseiras dos transtornos humanos. Além disso, as etiologias dos transtornos são muitas vezes desconhecidas. No caso da depressão (KRISHNAN E NESTLER, 2008), apesar de muito se saber sobre os processos neurais envolvidos no distúrbio, a etiologia e a sintomatologia podem ser muito variáveis, dificultando a reprodução de sua totalidade em animais experimentais.

Modelos animais como separação maternal, desamparo aprendido, derrota social, estresse crônico imprevisível ou administração crônica de corticosterona, induzem um estado que se assemelha ao conjunto de

sintomas comumente observado na depressão em humanos, tais como falta de motivação, anedonia, ansiedade e irritabilidade (NESTLER E HYMAN, 2010). Estes modelos teriam então valor de construto (estresse levando ao aumento de corticosterona, que pode ser uma das causas da depressão em humanos) e de face (fenótipo comportamental similar ao dos humanos depressivos e altos índices de corticosterona plasmáticas). Apesar da boa validade de face e construto, estes paradigmas deram origem a testes de predição (preferência por sacarose, interação social, labirinto em cruz elevado, campo aberto, etc.) pouco sensíveis (muitos resultados negativos) ou pouco específicos (que geram muitos resultados falsos positivos) (BELZUNG, 2014). Os testes baseados no modelo de “desespero comportamental”, como o nado forçado e o teste de suspensão pela cauda (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; NESTLER *et al.*, 2002) têm boa validade preditiva, apesar da baixa validade de construto e de face. Portanto, seriam melhor classificados como testes preditivos de atividade farmacológica do que modelos de depressão propriamente ditos.

O modelo de “desespero comportamental” prevê que o comportamento dos animais será inibido mediante a aplicação de um estresse de caráter incontrolável e inescapável. Essa inibição comportamental está relacionada com o tempo de imobilidade dos animais. No teste de nado forçado o pré-teste de 15 minutos funciona como um estressor, deste modo, o animal apresenta um tempo maior de imobilidade no teste, do que se não fosse submetido ao estímulo estressor anteriormente (PORSOLT *et al.*, 1978). Esse maior tempo de imobilidade no teste, permite que o efeito de redução deste comportamento causado pela administração de antidepressivos, seja observado. Nos primeiros minutos do pré-teste, os animais demonstram majoritariamente comportamentos ativos, que no decorrer dos 15 minutos vão se intercalando com o comportamento inativo chamado de imobilidade, e nos últimos minutos a imobilidade é o comportamento majoritariamente exibido pelos animais (PORSOLT *et al.*, 1977). Neste modelo, os fármacos antidepressivos que modulam o sistema monoaminérgico diminuem o tempo de imobilidade dos animais em administrações agudas (1 ou 3 injeções entre o pré-teste e o teste, PORSOLT *et al.*, 1979; DETKE; JOHNSON; LUCKI, 1997). Assim, o teste do nado forçado ou teste de Porsolt é útil para fazer triagens rápidas de substâncias com potencial antidepressivo. Apesar desta utilidade, o descompasso entre o efeito agudo dos fármacos no teste e a necessidade de tratamento crônico para se obter efeito na clínica põe contra a sua validade preditiva.

Para se melhorar a validade preditiva do teste de nado forçado, mantendo suas características úteis, várias alterações de protocolo foram

tentadas (DETKE; JOHNSON; LUCKI, 1997; MEZADRI *et al.*, 2011). Deste modo, foi desenvolvida uma modificação deste protocolo, que recebe o nome de nado forçado repetido (TNF-r), onde são feitas 4 sessões de nado forçado (MEZADRI *et al.*, 2011). Os dois primeiros dias experimentais são semelhantes ao do teste de Porsolt quando ocorre o pré-teste de quinze minutos seguido, vinte e quatro horas após, pela sessão teste. Sete dias após o pré-teste é feita a terceira sessão (chamada de reteste 1) e sete dias após o reteste 1 é feita a quarta e última exposição (reteste 2). Os retestes, assim como a sessão teste, duram cinco minutos. Esta modificação do protocolo permite a observação tanto de efeitos do tratamento agudo quanto dos crônicos, utilizando os mesmos animais. A utilização dos mesmos animais para aferir os efeitos dos tratamentos agudo e crônico reduz o número de animais necessário para o estudo de uma substância com potencial antidepressivo. Além disso, é possível observar o efeito comportamental com doses diárias dos fármacos antidepressivos menores do que as utilizadas no teste de Porsolt.

As doses diárias de fluoxetina (FLX) que foram efetivas no TNF-r (2,5 mg/kg) são mais próximas à dose utilizada em humanos (20mg/50-70kg) (CANTRELL; GILLESPIE; ALTSHULER, 1999) do que aquelas tradicionalmente empregadas no teste de Porsolt (20-30 mg/kg, DETKE E LUCKI, 1995). Apesar das aparentes vantagens do TNF-r, existem vários aspectos deste teste que ainda necessitam validação, como por exemplo não se sabe como seria o comportamento de fêmeas submetidas a este teste e sua resposta ao tratamento com antidepressivos.

1.3. Teste do nado forçado repetido: relevância do sexo dos ratos

Existem evidências que a depressão, com seus sintomas mais característicos de insônia, variações de humor e apetite, anedonia, dificuldades de concentração e pensamentos suicidas, é mais comum em mulheres (MARCUS *et al.*, 2005, 2008). Além disso, foi observado nestes estudos que mulheres são 63% dos pacientes, e também apresentam os sintomas mais severos do transtorno, como tentativas de suicídio (MARCUS *et al.*, 2005, 2008).

Muito usado na pesquisa básica para triagem de fármacos com potencial antidepressivo, o teste do nado forçado é um protocolo estressante, fato que precisa ser levado em consideração visto que ratas fêmeas mostram uma maior resposta e desregulação do eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA) quando submetidas a estresse (GOEL; INNALA; VIAU, 2014; XING *et al.*, 2013). Assim, conduzir a pesquisa básica somente em animais machos pode levar a resultados clínicos não favoráveis, visto que a oscilação hormonal observada em mulheres e também nas ratas pode ter relação com essa incidência e a resposta ao

tratamento. Portanto, modelos animais que levem em consideração o sexo dos animais podem ter maior validade de construto que aqueles que desprezam a relevância desta variável. Organismos que se assemelhem mais ao organismo feminino podem ser úteis para se desenvolver novas substâncias mais efetivas no tratamento dos transtornos de humor nas mulheres. Levando em consideração essa existência de diferenças sexuais, a agência de financiamento norte-americana NIH publicou novas diretrizes de financiamento de pesquisas, onde os pesquisadores devem planejar seus projetos para levar em consideração a existência de diferenças sexuais, e realizar os testes experimentais em ambos os sexos (COLLINS E TABAK, 2014).

A literatura parece ser bem consistente no que diz respeito às respostas comportamentais de ratos no teste de nado forçado (PORSOLT *et al* 1977,1978; DETKE; JOHNSON; LUCKI, 1997; DETKE E LUCKI, 1995). Dados prévios do nosso laboratório mostraram que no TNF-r o tempo de imobilidade dos ratos aumenta ou tende a aumentar com a repetição do teste (MEZADRI *et al.*, 2011; POSSAMAI *et al.*, 2015). O efeito da repetição é abolido com tratamento intraperitoneal (i.p.) com 2,5 mg/Kg de fluoxetina ou imipramina (POSSAMAI *et al.*, 2015). Fatos que confirmaram dados obtidos por Cryan, Page e Lucki (2005), que mostraram o efeito de redução do tempo de imobilidade, também em machos, no teste do nado forçado de Porsolt, com 14 dias de tratamento com fluoxetina, com a mesma dose (2,5mg/kg) e também na dose de 10mg/kg.

Já a literatura relatando experimentos em ratas parece ter uma vasta heterogeneidade de resultados, o que pode ser decorrente das formas variáveis de como os experimentos são programados, seja para levar em conta as fases do ciclo estral ou para eliminar sua influência (Tabela 1, para revisão ver KOKRAS *et al*, 2015). Para construir a Tabela 1 foi feita uma busca na base de dados PubMed com as palavras chave “female rats” + “forced swimming test” + “antidepressant” resultou em um total de 171 artigos. Destes, foram excluídos os que não se apresentavam em inglês, as revisões, os que não usavam fármacos antidepressivos “clássicos” (ISRS, IRNS), os que tratavam sobre os efeitos sobre a concepção ou a prole, e os que observavam somente efeitos neuroquímicos, resultando em um total de 15 artigos. No geral, observa-se que ratas castradas ou não castradas respondem ao tratamento com inibidores da recaptação de noradrenalina e serotonina (IRNS) de maneira semelhante aos ratos enquanto que a respostas comportamentais aos ISRS são variáveis, dependendo se as ratas foram castradas antes dos experimentos ou não.

Em ratas castradas para eliminar a influência do ciclo estral sobre o comportamento, Li *et al* (2014) mostraram que a ovariectomia produz um aumento de imobilidade destes animais no nado forçado quando comparadas a ratas não castradas, além de mudanças em outros testes comportamentais. A ovariectomia aboliu o efeito do tratamento com sertralina (SELL *et al.*, 2008) e cetamina (CARRIER E KABBAJ, 2013). Em fêmeas não castradas, foi observado que a amitriptilina, um antidepressivo tricíclico, nas doses de 10, 15 e 20 mg/kg administradas 1, 20 e 23 horas antes do teste, reduziu a imobilidade no teste do nado forçado clássico (ENRÍQUEZ-CASTILLO *et al.*, 2008). Porém, na mesma condição, a fluoxetina na dose de 5 mg/kg não teve efeito em ratas (MITIC *et al.*, 2013; LIFSCHYTZ *et al.*, 2006). Em ratas castradas, Benmansour *et al.* (2012) mostraram que a reposição hormonal em conjunto com o tratamento com fluvoxamina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, administrados 75 horas antes do nado, não teve efeito sobre o tempo de imobilidade. Porém, quando o tratamento é crônico, doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg tanto de Fluoxetina, um inibidor seletivo de recaptação de serotonina, quanto de desipramina, um antidepressivo tricíclico, exercem seus efeitos de diminuição de imobilidade no teste do nado forçado em 3 semanas em ratas castradas sem reposição hormonal (ESTRADA-CAMARENA *et al.*, 2011), já quando estradiol é administrado juntamente com os antidepressivos, vemos o efeito da fluoxetina a partir do 3º dia e da desipramina no 14º dia, na dose de 1,25 mg/kg (ESTRADA-CAMARENA *et al.*, 2008). No teste do nado forçado, o tratamento com dose de 10 mg/kg de FLX tem efeito somente nos ratos, sejam eles estressados (ABDEL-SATER; ABDEL-DAIEM; BAKHEET, 2012) ou não (GÓMEZ *et al.*, 2014).

Tabela 1 - Resultados de estudos com ratas no teste do nado forçado.

	Linhagem	OVX	Fase do Ciclo	Protocolo FST	Tratamento (fármaco, dose, regime)	Resultado
Benmansour <i>et al.</i> , 2012	SD	S	OVX	Modificado	FVX + Reposição Hormonal	Sem efeito
Craft <i>et al.</i> 2010	SD	N	V e PP	Modificado	SRT10mg/Kg	Sem efeito

					DMI10mg/Kg	Sem efeito
De Oliveira <i>et al.</i> 2004	w	N	ND	Modificado	VLX1 10mg/Kg e	VEN10mg/Kg ↓imobilidade
De Vry <i>et al.</i> , 1999	cA A	N	ND	Clássico	IMI 3 – 30mg/Kg	IMI30mg/Kg ↓imobilidade
					FLX 1 – 30mg/Kg	FLX10 e 30mg/Kg ↓imobilidade
Enríquez-Castillo <i>et al.</i> , 2008	W	N	ND	Modificado	AMT 10, 15 e 20mg/kg	↓imobilidade
Estrada-Camarena <i>et al.</i> , 2008	W	S	OVX	Modificado	FLX 1,25mg/kg + E2	↓imobilidade
					DMI 1,25mg/kg+ E2	↓imobilidade
Estrada-Camarena <i>et al.</i> , 2011	W	S	OVX	Modificado	FLX 2,5; 5 e 10mg/kg	↓imobilidade
					DMI 2,5; 5 e 10mg/kg	↓imobilidade
Flores-Serrano <i>et al.</i> , 2013	W	N	ND	Modificado	AMI 15mg/Kg	↓imobilidade
					RBX 0,16 ou 1mg/Kg	0,16:↓imobilidade nos animais com alta imobilidade
					CLP 0,4; 1,3 ou 10mg/Kg	Sem efeito
Gómez <i>et al.</i> , 2014	W	N	OVX ou ND	Modificado	FLX 2,5; 5 e 10mg/Kg	5 e 10mg/Kg ↓imobilidade

Li <i>et al.</i> , 2013	LE	N	ND	Só pré-teste	Ret. P. DLX20mg/Kg e	↓imobilidade
					AMI20mg/Kg	↓imobilidade
					FLX16mg/Kg	↑imobilidade
					VTX10mg/Kg	↓imobilidade
Lifschytz <i>et al.</i> , 2006	W	N	ND	Modificado	FLX 5mg/kg	Sem efeito
McNamara <i>et al.</i> , 2013	LE	N	ND	Modificado	FLX 10mg/Kg	Sem efeito
Mitic <i>et al.</i> , 2013	W	N	ND	Modificado	FLX 5mg/kg	Sem efeito
Molina-Hernández; Téllez-Alcántara 2011	W	S	OVX	Modificado	FLX15 e 20mg/Kg	FLX20mg /Kg; ↓imobilidade
Molina-Hernández; Téllez-Alcántara, 2001	W	S e N	OVX e não-OVX	Modificado	CMI1,25mg/Kg	↓imobilidade nas OVX,
					DMI2,14mg/Kg	durante a gravidez, mas não após o parto
Pic-Taylor <i>et al.</i> , 2015	W	N	ND	Modificado	FLX20mg/Kg	Sem efeito
Récamier-Carballo <i>et al.</i> 2012	W	S	OVX	Modificado	FLX1,25; 2,5; 10mg/Kg Com E2	FLX10+E2 ↓imobilidade
					FLX1,25; 2,5; 10mg/Kg Sem E2	FLX2,5 e 10mg/Kg ↓imobilidade
Sell <i>et al.</i> , 2008	SD	S	OVX	Modificado	SRT10mg/Kg	Associado a E2 ↓imobilidade

					IMI10mg/Kg	Sem efeito
Shah; Frazer, 2014	SD	S	OVX	Modificado	DMI 7,5; 10 ou 15mg/Kg (agudo ou crônico)	10mg/Kg, agudo e crônico: ↓ imobilidade.
					DMI 7,5; 10 ou 15mg/Kg (agudo ou crônico) + reposição hormonal	7,5mg/Kg, crônico: ↓ imobilidade.

Abreviações: AMT= Amitriptilina; cAA= linhagem com alta preferência por álcool; CMI= clomipramina; CLP= citalopram; DMI= desipramina; E2= estradiol; FLX= Fluoxetina; FVX= fluvoxamina; imb= imobilidade, IMI= imipramina; N= não; ND=não determinado; OVX= ovariectomia; PP= pós-parto; S= sim; SD= sprague-dawley, SRT= sertralina; TNF= Teste do nado forçado; V= virgens; VEN= venlafaxina; W= wistar, modificado= nado forçado com 30cm de água.

A diferença de comportamento entre machos e fêmeas também foi observada em vários outros testes comportamentais, como condicionamento positivo (HAMMERSLAG E GULLEY, 2013) e campo aberto (LUO *et al.*, 2013). Essas diferenças podem ser associadas com os diferentes modos de “*coping*” utilizados por ratos machos e fêmeas frente a situações aversivas (SVOBODA *et al.*, 2012; HAMMERSLAG E GULLEY *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2013). As diferenças sexuais não estão apenas restritas ao comportamento basal, também sendo observadas no efeito do tratamento de fármacos nestes mesmos testes. Diferentes doses de antidepressivos geram diferentes respostas em ratos machos e fêmeas no teste do campo aberto e do labirinto em Y (GRAY E HUGHES, 2015). Diazepam e anfetamina também sofrem influências do sexo no labirinto em cruz elevado e no teste de atividade locomotora (SIMPSON *et al.*, 2012). Deste modo, por existirem evidências de influência do dimorfismo sexual sobre os comportamentos ou na resposta aos fármacos testados, faz-se necessária a validação dos testes comportamentais em ambos os sexos.

Uma série de mecanismos neurobiológicos pode ser relacionada à influência do dimorfismo sexual sobre o comportamento e a resposta ao tratamento com fármacos. Já se observou que a resposta de ratas ao tratamento com FLX é distinta da apresentada pelos machos. Mitsushima *et al.* (2006) mostraram que, na amígdala basolateral, ratos apresentam uma maior concentração de 5-HT basal do que as ratas, porém, essa

diferença se reverte quando os animais são submetidos a estresse de contenção. Em relação à expressão do auto-receptor pré-sináptico inibitório 5-HT_{1A}, os ratos apresentam uma menor expressão no hipocampo (ZHANG *et al*, 1999). Essas diferenças sexuais são observadas também em humanos, onde foi observado que a síntese de 5-HT no cérebro de homens saudáveis é mais elevada que do que em mulheres (NISHIZAWA *et al*, 1997). Deste modo, é possível que o dimorfismo sexual do sistema serotoninérgico esteja subjacente às diferenças comportamentais e de respostas aos fármacos observadas entre ratos machos ou fêmeas.

Sendo assim nossa hipótese é que existem diferenças sexuais na resposta ao tratamento com FLX em ratos submetidos ao TNF-r, e que estas diferenças estariam relacionadas ao sistema serotoninérgico.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Descrever o comportamento e a resposta de ratas fêmeas ao tratamento com fluoxetina no nado forçado repetido e compará-los ao de ratos machos.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar o comportamento de ratas fêmeas no TNF-r
- Comparar as respostas comportamentais de fêmeas e machos ao TNF-r.
- Analisar a resposta comportamental de ratas fêmeas ao tratamento com Fluoxetina no TNF-r.
- Comparar as respostas comportamentais de ratas fêmeas e ratos machos ao tratamento com Fluoxetina no TNF-r.
- Avaliar e comparar as concentrações e o metabolismo da serotonina no cérebro de ratos machos e fêmeas.

3. Estratégia de Estudo e Desenho Experimental

Para atingir os objetivos deste trabalho foram desenhados dois experimentos. O experimento Piloto tinha como principal objetivo padronizar o método de administração do fármaco por via oral (SCHLEIMER; JOHNSTON; HENDERSON., 2005). Foi utilizada a dose de FLX 2,5mg/kg que por via i.p. reduziu a imobilidade no TNF- α de ratos em estudos prévios (POSSAMAI *et al*, 2015). Os ratos foram aqui utilizados como controle positivo do método visto que tanto o seu comportamento no teste quanto sua resposta ao tratamento com o fármaco já são conhecidos (MEZADRI *et al.*, 2011; POSSAMAI *et al*, 2015). Os cérebros destes animais foram usados para determinação das concentrações teciduais de serotonina (5-HT) e seu metabólito 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA) método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção eletroquímica.

O experimento comportamental (ver Figura 1) consiste na realização de uma curva dose-resposta para o fármaco nas ratas. Novamente, os ratos foram utilizados como controle positivo. Ao final deste experimento, os animais veículo, ou seja, tratados com sacarose, de ambos os sexos e os animais de ambos os sexos tratados com FLX 2,5mg/kg foram sacrificados e as estruturas de seus cérebros foram dissecadas para um ensaio *in vitro* para avaliar a influência do sexo na recaptção de 5-HT pelos tecidos (LINDER *et al.*, 2011). A 5-HT e o metabólito 5-HIAA foram detectados por CLAE.



Figura 1 – Esquema do desenho experimental. Tto= tratamento; v.o.= via oral.

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais e condições de alojamento

Ratos Wistar machos e fêmeas foram alojados no biotério de experimentação BIO066 em ciclo claro-escuro invertido (luzes acesas às 18h), agrupados de 3 a 4 por caixa, com troca de caixa três vezes por semana (segunda, quarta e sexta). Todos os procedimentos utilizados neste projeto foram aprovados pelo CEUA-UFSC (PP00764). Os animais chegaram com 21 dias de idade ao biotério, foram alojados e cuidados até atingirem os 40 dias de idade, momento em que foi iniciado o tratamento.

4.2. Procedimentos para administração de substâncias por via oral: treinamento e administração por ingestão espontânea

Uma semana antes do início do tratamento, os animais foram treinados a consumir 1,5 mL de uma solução de sacarose 5% via oral, para o experimento piloto, e de 10% no experimento comportamental. (Método adaptado de Schleimer, Johnston e Henderson (2005)). Um por um, eles eram retirados de sua caixa moradia e colocados em uma caixa individual. Foi então permitido a exploração da caixa por um tempo entre 1 a 2 minutos. Após este tempo, foi apresentada ao animal uma seringa sem agulha com a solução de sacarose, para que fosse consumida, enquanto o êmbolo era vagarosamente pressionado pelo experimentador, para que toda a solução fosse consumida pelo animal, sem perdas.

Após este período de treino, os animais foram separados em grupos. No experimento piloto os animais foram separados em grupos controle e tratado dentro de seu respectivo sexo, os grupos controle receberam sacarose 5% (veículo), enquanto os grupos tratados receberam cloridrato de fluoxetina 2,5 mg/kg. No experimento comportamental; os grupos controle receberam sacarose 10% (veículo), os ratos tratados receberam cloridrato e fluoxetina dissolvido em solução de sacarose na dose de 2,5 mg/kg, enquanto as ratas tratadas receberam a mesma droga nas doses de 1 mg/kg; 2,5 mg/kg e 5 mg/kg. A dose de 5 mg/kg foi escolhida como a maior visto que via oral, as concentrações séricas da dose de 5mg/Kg e 10mg/Kg não variam significativamente (PAWLUSKI *et al*, 2014), e a dose de 1 mg/Kg foi escolhida como a menor visto que na análise da literatura nenhum estudo observou efeito comportamental desta dose (ver Tabela 1).

Os animais foram submetidos ao pré-teste antes de começarem a receber os tratamentos designados. Os animais receberam a primeira administração do tratamento designado (veículo ou fluoxetina) uma hora antes de serem submetidos ao teste. Este tratamento então se repetiu diariamente, no mesmo horário, durante as duas semanas seguintes. O reteste 1 e o reteste 2 ocorreram uma hora após a administração no sétimo e décimo quarto dias após o pré-teste.

4.3. Procedimentos de determinação do ciclo estral

Antes de cada sessão de nado, o ciclo das fêmeas foi avaliado por lavado vaginal com salina 0,9%, para observação da morfologia celular em microscópio óptico para determinação das diferentes fases. As diferentes fases (ver Figura 2) foram categorizadas da seguinte maneira, segundo Marcondes, Bianchi e Tanno (2002):

- Metaestro foi determinado pela presença de leucócitos e células cornificadas, em proporção semelhante.
- Diestro foi determinado pela presença de leucócitos e muco.
- Proestro foi determinado pela presença de lâminas de células epiteliais e/ou células epiteliais nucleadas.
- Estro foi determinado pela presença majoritária de células cornificadas.

As fases do ciclo foram determinadas diariamente para que pudesse ser feita uma relação da fase do ciclo com o comportamento, e verificar se haveriam diferenças comportamentais entre as diferentes fases do ciclo.

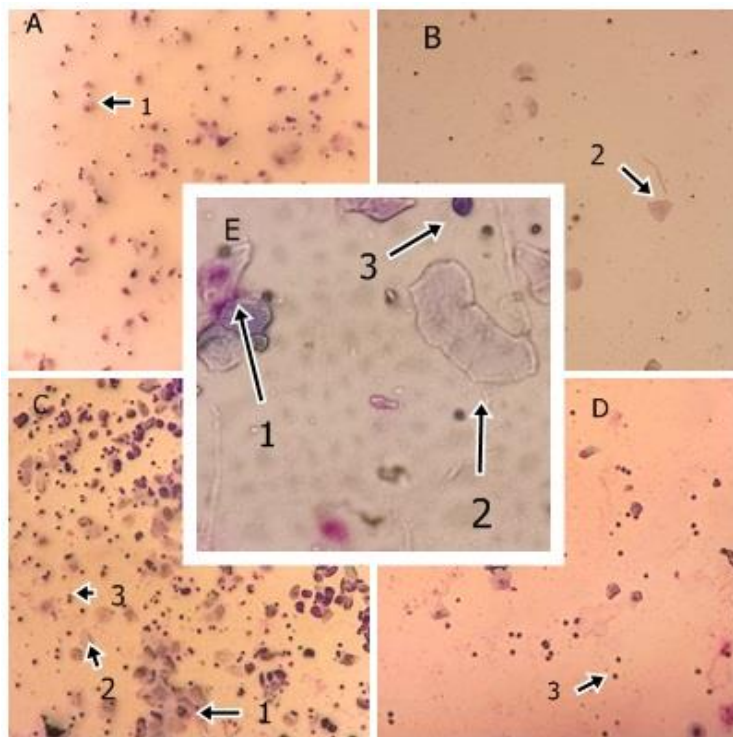


Figura 2 – Fotomicrografias do lavado vaginal corado com coloração de Giemsa para a determinação das fases do ciclo estral. 1 – Célula epitelial nucleada; 2 – Célula cornificada anucleada; 3 – Leucócito. A – Proestro (determinado pela presença majoritária de células epiteliais nucleadas); B – Estro (determinado pela presença majoritária de células cornificadas anucleadas); C – Metaestro (determinada pela presença de quantidades semelhantes dos 3 tipos celulares); D- Diestro (determinado pela presença majoritária de leucócitos); E – detalhe das células em aumento maior

4.4. Procedimentos do TNF-r

O Teste do Nado Forçado Repetido consiste em um pré-teste de 15 minutos seguido por um teste de 5 minutos, 24 horas depois. Este teste de 5 min. é repetido no sétimo (reteste 1) e décimo quarto (reteste 2) dias após o pré-teste (MEZADRI *et al.*, 2011). Cada sessão foi então gravada por webcam posicionada a 30 cm acima do recipiente para posterior análise dos comportamentos utilizando o software EthoWatcher (CRISPIM JUNIOR *et al.*, 2012). Os comportamentos observados foram categorizados como descrito a seguir:

- Nado foi determinado pelo movimento horizontal das patas dianteiras, com deslocamento pela circunferência da cuba, ou atravessando a cuba de um lado ao outro.

- Escalada foi determinada pelo movimento vertical das patas dianteiras, podendo ser realizado tanto nas paredes da cuba, quanto no meio dela, com ou sem deslocamento.

- Mergulho foi determinado quando o animal coloca toda a cabeça embaixo d'água.

- Imobilidade foi determinada pela ausência de movimentação ativa, sem deslocamento, com apenas os movimentos de patas necessários para manter a cabeça fora d'água.

Foram analisados os parâmetros latência, frequência e duração de cada categoria comportamental.

Latência consiste do tempo entre o início do teste ou reteste e o primeiro episódio de um dado comportamento.

Frequência consiste do número de vezes que o animal iniciou um episódio de um dado comportamento durante o período do teste ou reteste.

Duração é o tempo gasto pelo animal executando um dado comportamento durante o período de teste ou reteste.

4.5. Avaliação da função dos transportadores de 5-HT no cérebro de ratos machos e fêmeas adultos jovens

Método adaptado de Linder *et al.* (2011). Os animais tratados *in vivo* com FLX 2,5mg/kg ou veículo foram anestesiados logo após a sessão de reteste 2 do TNF-r, e decapitados em guilhotina para a dissecação das estruturas cerebrais determinadas.

Para o experimento Piloto, foram dissecadas as regiões do córtex frontal, hipocampo, tronco e cerebelo. Para o experimento neuroquímico, foram dissecadas somente as regiões do córtex frontal e hipocampo (Figura 3). Após dissecação, as estruturas foram colocadas em solução nutritiva (PSS: NaCl 131,3mM; KCl 4,7mM; KH_2PO_4 1,18mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,17mM; NaHCO_3 14,9mM; Dextrose 5,5mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,6mM; EDTA 0,03mM), mantida a 37°C, por 30 minutos. Após este tempo, foi adicionado 1µM de 5-HT, ou 10µL de veículo (água miliQ) à solução contendo a estrutura. Após 15 minutos cada estrutura foi lavada 3 vezes com solução nutritiva, armazenadas separadamente em eppendorfs contendo solução de ácido

perclórico e metabissulfito, e congeladas em -80°C até o momento de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção eletroquímica.

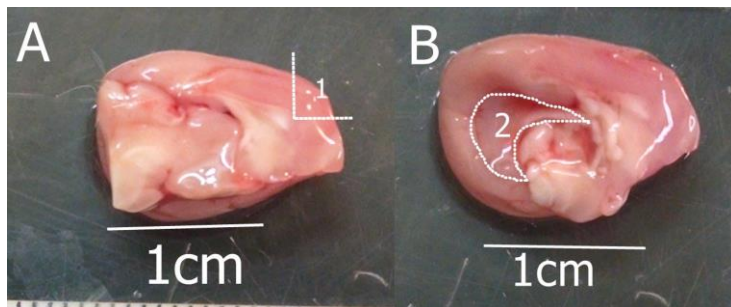


Figura 3 - Cortes sagitais das estruturas do encéfalo de rato, dissecadas para o ensaio de funcionalidade do transportador de 5-HT (SERT) para o experimento 1. 1. A- Corte sagital, 1 indica o córtex frontal; B – Corte sagital com o estriado removido onde 2 indica o hipocampo.

4.6. Procedimentos para a CLAE com detecção eletroquímica

As amostras foram descongeladas, maceradas e colocadas por 10 minutos em banho gelado de ultrassom. Após este tempo foram centrifugadas a 14500 rpm a 4°C , por 20 minutos. De cada amostra foi retirado o sobrenadante para análise. Juntamente com as amostras foi preparada uma curva padrão com concentrações crescentes de 5-HT e seu metabólito, Ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA); de 10 a 1000 ng/mL.

A todas as amostras e concentrações da curva padrão foi adicionado o padrão interno do equipamento, ácido diidróxibenzóico (DHBA), para controle da sensibilidade do eletrodo ao longo da análise.

Os dados dos tecidos incubados com 5-HT foram expressos em porcentagem do basal, pela fórmula $\text{incubado} \cdot 100 / \text{basal}$

5. Análise Estatística

Para determinação de qual teste estatístico seria usado, todos os dados passaram pelo teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov e o teste de Levene para a determinação da homogeneidade de variância. Os dados comportamentais tiveram distribuição normal e foram analisados por ANOVA de 2 vias com medidas repetidas (fatores tratamento e repetição) seguida do teste post-hoc de Duncan para cada sexo. As dosagens de 5-HT e 5-HIAA no experimento piloto não tiveram distribuição normal e foram analisadas por Kruskal-Wallis seguido de post-hoc de Mann-Whitney. O segundo experimento das dosagens de 5-HT e 5-HIAA (experimento neuroquímico) tiveram distribuição normal e foram analisados por ANOVA de uma via, seguidas de post-hoc de Duncan.

6. Resultados

6.1. Comportamento de ratos machos e fêmeas no TNF-r

6.1.1. Experimento Piloto:

Ao verificarmos a ausência de diferenças comportamentais entre as fases do ciclo, neste e em experimentos anteriores, prosseguimos com a análise dos dados sem considerá-las. Os dados de latência de todos os comportamentos não são mostrados por apresentarem uma grande variação, assim como os parâmetros do mergulho. Os dados de duração de imobilidade foram expressos em segundos e também como o delta entre a duração de imobilidade no teste e nos retestes. O delta 1 consiste da subtração dos valores medidos do reteste 1 dos valores medidos no teste, e o delta 2 consiste da subtração dos valores medidos do reteste 2 dos valores medidos no teste.

Os animais foram treinados por 7 dias a ingerir sacarose 5%. No final dos 7 dias todos os animais ingeriam a solução espontaneamente a partir da ponta de uma seringa sem agulha. No dia do teste os animais do grupo experimental receberam a solução de sacarose 5% acrescida de FLX 2,5mg/Kg, enquanto o grupo controle recebeu sacarose 5%. O acréscimo de FLX a sacarose 5% parece ter conferido sabor desagradável à solução visto que os animais apresentavam aversão à seringa e resistiram ao tratamento. O tratamento do grupo experimental foi, portanto, forçado e não espontâneo. Por razão desta ocorrência, no dia seguinte ao teste a concentração de sacarose utilizada como veículo foi elevada para 10% e os animais passaram a ingerir a solução espontaneamente. Assim, os resultados comportamentais do teste podem ter sido afetados por esta situação. Na verdade, observamos um aumento expressivo, apesar de não significativo, da duração de imobilidade no teste em todos os animais tratados com FLX 2,5mg/Kg solubilizada em sacarose 5% em relação ao grupo controle tratado somente com sacarose 5%.

Nos machos controle, tratados com sacarose 5% no teste e com sacarose 10% nos retestes, a repetição não afetou a duração nem a frequência dos comportamentos analisados (Tabelas 2 e 3). Nos machos tratados com FLX 2,5mg/Kg a repetição afetou somente a duração de escalada, que é significativamente maior no reteste 2 do que no teste. Também não houve diferença na duração de imobilidade e de nado dos animais tratados em relação aos animais controle. Já na duração de escalada, temos uma redução significativa deste parâmetro nos machos tratados com FLX 2,5mg/Kg no teste e no reteste 1. Quando olhamos para as frequências destes mesmos animais, observamos que a repetição também não afetou as frequências dos comportamentos analisados. Mas

o fator tratamento teve efeito somente sobre a frequência de imobilidade, que é significativamente menor nos animais tratados em relação aos animais controle no reteste 1 (Tabelas 2 e 3)

Nas fêmeas controle, não houve efeito da repetição sobre as durações dos comportamentos analisados. Nas fêmeas tratadas com FLX 2,5mg/Kg a repetição também não afetou as durações dos comportamentos analisados. Em relação ao tratamento, vemos um aumento substancial e significativo na duração de imobilidade dos animais tratados, em relação aos animais controle no reteste 1, acompanhado de uma diminuição na duração de escalada destes mesmos animais, também no reteste 1.

Nas fêmeas controle, houve efeito da repetição somente a frequência de nado, sendo significativamente menor no reteste 1 do que no teste. Nas fêmeas tratadas com FLX 2,5mg/Kg a repetição não surtiu efeito sobre os comportamentos analisados. Em relação ao tratamento, houve uma redução significativa na frequência de imobilidade dos animais tratados em relação aos animais controle nos retestes 1 e 2. As frequências de nado e escalada não foram afetadas pelo tratamento.

A partir dos resultados do experimento piloto foi possível concluir que a solução de sacarose 10% era mais adequada como veículo do que a sacarose 5%. Além disso, observamos que a duração da imobilidade não diminuiu significativamente entre o teste e os retestes nas ratas tratadas com a FLX 2,5mg/Kg. Assim, no experimento comportamental foi utilizada a sacarose 10% como veículo da FLX e como tratamento do grupo controle nos ratos machos e fêmeas. Além disso, uma dose maior e uma menor de FLX foi testada nas fêmeas.

Tabela 2 - Durações dos comportamentos no TNF –r dos ratos machos e fêmeas no experimento piloto: efeitos dos fatores repetição e tratamento.

Categoria	Sessões	Macho		Fêmea	
		Ctrl n=5	FLX n=5	Ctrl n=5	FLX n=5
Imobilidade	T	76,1±45,7	153,3±32,5	92,8±43,1	154,7±24,4
	R1	95,1±34,7	130±55,6	63,5±68,3	154,2±33,4*
	R2	125,4±83,1	128,2±35,3	123,5±50,3	138±30,2
Repetição		F(2,8)=1,2; p=,3	F(2,8)=3,6; p=,07	F(2,8)=1,3; p=,3	F(2,8)=,5; p=,6
Tratamento		F(1,8)=2,2; p=,1		F(1,8)=14,8; p=,004 Post-hoc: R1 p=,006	
Nado	T	52,8±38,3	73,9±16,5	113,2±31	102,4±41,6
	R1	34,8±25,8	75±33,3	106,8±75,7	104,3±25,1
	R2	68±76,1	61,2±29,4	124,7±24,5	124,3±24
Repetição		F(2,8)=,37; p=,6	F(2,8)=,8; p=,45	F(2,8)=,3; p=,7	F(2,8)=,8; p=,45
Tratamento		F(1,8)=2,1; p=,1		F(1,8)=,05; p=,8	
Escalada	T	154,5±46,8	59,4±10,9*	72,1±30,6	33,3±26,2
	R1	160,9±21,1	88,5±38,2*	125,2±41,5	37,6±25,5*
	R2	99,9±69,1	101,8±24,3 [#]	47,1±35,1	32,8±21,4
Repetição		F(2,8)=4,1; p=,06	F(2,8)=4,7; p=,04 Post-hoc: p=,01	F(2,8)=5,3; p=,03	F(2,8)=,4; p=,69
Tratamento		F(1,8)=6,7; p=,03 Pos-hoc: T p=0,004; R1 p=,02		F(1,8)=13,1; p=,006 Post-hoc: R1 p=,0003	

Dados expressos em segundos, média ± erro padrão. ANOVA medidas repetidas com post-hoc de Duncan. * = diferença em relação ao controle; [#] = diferença em relação ao teste, T = teste, R1 = reteste 1, R2= reteste 2.

Tabela 3 - Frequência dos comportamentos no TNF –r dos ratos machos e fêmeas no experimento piloto: efeitos dos fatores repetição e tratamento.

Categoria	Sessões	Macho		Fêmea	
		Ctrl n=5	FLX n=5	Ctrl n=5	FLX n=5
Imobilidade	T	5±2,5	2,4±0,9	5,8±2,8	5±1,9
	R1	8,8±3,3	4,4 ±2,1*	2,2±2,8	4,2±1,8
	R2	7±4,3	3±2*	4±1,7	4,4±1,7
Repetição		F(2,8)=1,2; p=,3	F(2,8)=1,7; p=,2	F(2,8)=3,7; p=,07	F(2,8)=,3; p=,7
Tratamento		F(1,8)=20,2; p<,0001 Post-hoc: R1 p=0,02; R2 p=0,04		F(1,8)=,3; p=,59	
Nado	T	3,8±2,2	6,4±2,3	10,2±3,3	8,4±4,9
	R1	4±1,4	5,4±2,3	4,8±1,9 [#]	5,6±2,1
	R2	5,2±3,8	5,6±0,5	6,4±2,4	6,8±2,3
Repetição		F(2,8)=,4; p=,6	F(2,8)=,5; p=,6	F(2,8)=4,7; p=,04	F(2,8)=1,2; p=,3
Tratamento		F(1, 8)=2,3; p=,1		F(1,8)=,02; p=,8	
Escalada	T	5,6±1,7	3±1	3,4±1,5	4,4±3
	R1	6,6±2,9	4,4±2,1	5,4±1,9	2,4±1,1
	R2	7,6±4,2	5,2±1,5	3,2±2	3,2±2
Repetição		F(2,8)=,6; p=,55	F(2,8)=3,6; p=,07	F(2,8)=1,8; p=,2	F(2,8)=1,7; p=,2
Tratamento		F(1,8)=5,1; p=,052		F(1,8)=,6; p=,45	

Dados expressos em média ± erro padrão. ANOVA medidas repetidas com post-hoc de Duncan.

*= diferença em relação ao controle, [#]= diferença em relação ao teste, T = teste, R1 = reteste 1, R2= reteste 2.

6.1.2. Experimento Comportamental

Todos os dados estatísticos resultantes das análises comportamentais estão disponíveis nas Tabelas 4, 5, 6 e 7.

Para os machos controle, não foi observado efeito significativo da repetição sobre as durações ou frequências dos comportamentos analisados. Para os machos tratados com FLX 2,5mg/Kg, não foi observado efeito da repetição sobre a duração dos comportamentos analisados. Quanto ao fator tratamento, observamos redução da duração de imobilidade nos animais tratados em relação aos animais controle no TNF- α porém a significância apareceu no teste e reteste 2 (Figura 4, Tabela 4). Observamos também um aumento significativo da duração de nado dos animais tratados, em relação aos animais controle, no reteste 2 (Figura 4, Tabela 4).

Não observamos efeito do tratamento sobre a duração de escalada destes animais.

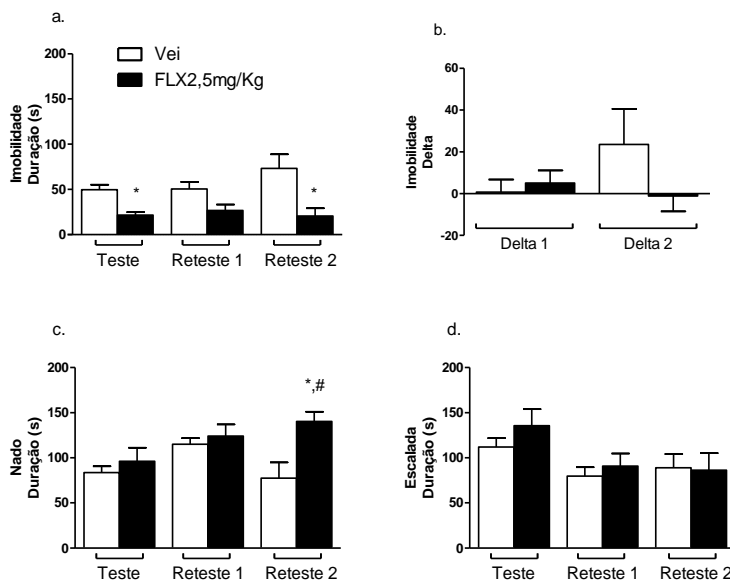


Figura 4: Durações dos comportamentos dos ratos machos tratados com veículo (n=6, Vei, barras brancas, grupo controle) ou fluoxetina (n=6, FLX, 2,5 mg/kg, barras pretas) no teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r. Efeito dos fatores repetição e tratamento. a) Duração (s) da Imobildade; b) Diferença das durações (s) de imobildade entre o reteste 1 e o teste (delta 1) ou reteste 2 e teste (delta 2); c) Duração (s) do Nado; d) Duração (s) da Escalada. As barras representam a média \pm EPM. * = significativamente diferente do controle; # = significativamente diferente do teste, ANOVA de medidas repetidas seguida de post-hoc de Duncan, $p < 0,05$

Para os machos tratados com FLX 2,5mg/Kg observamos um efeito da repetição sobre a frequência de imobildade, sendo esta significativamente menor no reteste 2 do que no teste (Tabela 4). Quanto ao fator tratamento, observamos uma redução da frequência de imobildade nos animais tratados com FLX 2,5mg/Kg em relação aos animais controle, no teste e reteste 2 (Tabela 5). As frequências de nado e escalada não foram afetadas pelo tratamento.

Para as fêmeas controle, foi observado efeito da repetição sobre a duração de escalada, sendo esta menor nos retestes 1 e 2 do que no teste (Figura 6, Tabela 6). Para as fêmeas tratadas com FLX 1mg/Kg, observamos efeito da repetição sobre a duração de nado, sendo esta maior no reteste 2 do que no teste; e sobre a duração de escalada, sendo esta menor nos retestes 1 e 2 do que no teste (Figura 6, Tabela 6). Para as

fêmeas tratadas com FLX 2,5mg/Kg, não observamos efeito da repetição nos comportamentos analisados, porém, apesar de não significativo, vemos um aumento da imobilidade nos dois retestes (Figura 6, Tabela 6). Para as fêmeas tratadas com FLX 5mg/Kg, observamos efeito da repetição na duração do nado, sendo esta significativamente maior no reteste 1 do que no teste; e na duração de escalada, sendo esta menor no reteste 2 do que no teste (Figura 6, Tabela 6). Quanto ao fator tratamento, não observamos efeito significativo de nenhuma dose sobre as durações dos comportamentos analisados (Figura 6, Tabela 6).

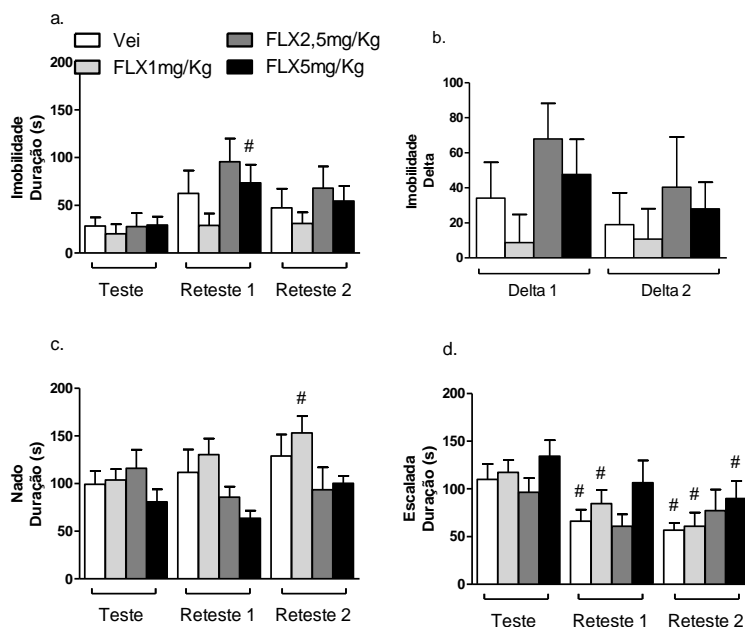


Figura 5: Durações dos comportamentos das ratas tratadas com veículo (n=9, Vei, barras brancas), fluoxetina 1mg/Kg (n=9, FLX1mg/Kg, barras cinza claro), fluoxetina 2,5mg/Kg (n=8, FLX2,5 mg/kg, barras cinza escuro), ou fluoxetina 5mg/Kg (n=8, FLX5mg/Kg, barras pretas) no teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r. Efeito dos fatores repetição e tratamento. a) Duração (s) da Imobilidade; b) Diferença das durações (s) de imobilidade entre o reteste 1 e o teste (delta 1) ou reteste 2 e teste (delta 2); c) Duração (s) do Nado; d) Duração (s) do Escalada. As barras representam a média \pm EPM. # = significativamente diferente do teste, ANOVA de medidas repetidas seguida de post-hoc de Duncan, $p < 0,05$

Para as fêmeas, independente do tratamento, não foi observado efeito da repetição sobre as frequências dos comportamentos analisados

(Tabela 7). Quanto ao fator tratamento, não observamos efeito significativo de nenhuma dose sobre as frequências dos comportamentos analisados (Tabela 7).

Não foi encontrada diferença sexual entre os animais controle para as durações dos comportamentos (Figura 8, Tabela 8), já para os animais tratados com FLX 2,5mg/Kg as fêmeas mostraram maior duração de imobilidade no reteste 1 (Figura 9, Tabela 8).

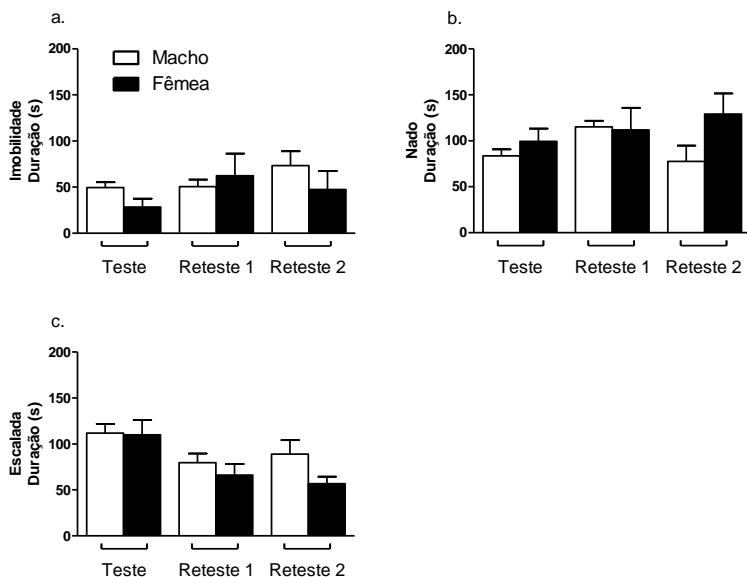


Figura 6: Durações dos comportamentos dos ratos machos (n=6, barras brancas) e fêmeas (n=9, barras pretas) tratados com veículo, no teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r. Efeito do fator sexo. a) Duração (s) de imobilidade; b) Duração (s) de nado; c) Duração (s) de escalada. As barras representam a média \pm EPM, ANOVA de medidas repetidas seguida de post-hoc de Duncan, $p < 0,05$.

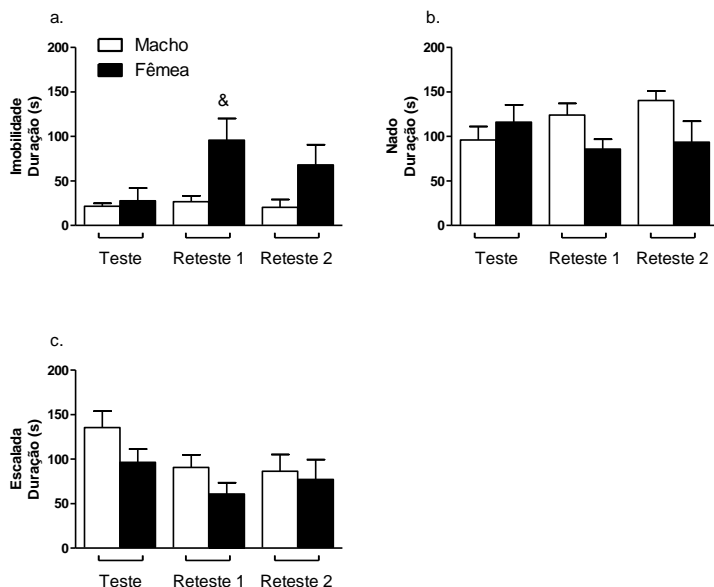


Figura 7: Durações dos comportamentos dos ratos machos (n=6, barras brancas) e fêmeas (n=9, barras pretas) tratados com fluoxetina 2,5mg/Kg, no teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r. Efeito do fator sexo. a) Duração (s) de imobilidade; b) Duração (s) de nado; c) Duração (s) de escalada. As barras representam a média \pm EPM, & - significativamente diferente do macho. ANOVA de medidas repetidas seguida de post-hoc de Duncan, $p < 0,05$

Com relação às frequências, observamos uma menor frequência de imobilidade das ratas controle no teste e reteste 1 (Tabela 9). Já nas ratas tratadas, foi observada uma maior frequência de nado no reteste 2 do que nos ratos (Tabela 9).

Tabela 4 - Durações dos comportamentos dos ratos no TNF-r: efeitos dos fatores repetição e tratamento.

Categoria	Sessões	Machos	
		Ctrl n=6	FLX n=6
Imobilidade	T	49,6±13,9	21,5±8,2*
	R1	50,4±19,4	26,6±16,3
	R2	73,2±38,4	20,4±21,5*
Repetição		F(2,10)=1,8; p=,2	F(2,10)=,3; p=,7
Tratamento		F(1,10)=16,5; p=,002 Post-hoc: T p=,04; R2 p=,0006	
Nado	T	83,5±17,3	96,1±37,2
	R1	115,1±16,9	124±32
	R2	77,6±42,4	140,3±26,4*#
Repetição		F(2,10)=2,2; p=,1	F(2,10)=4,8; p=,03 Post-hoc: p=0,01
Tratamento		F(1,10)=6,8; p=,02 Post-hoc R2 p=,002	
Escalada	T	112±24,4	135,5±45,1
	R1	79,75±24,15	90,68±34,60
	R2	88,99±37,27	86,49±46,06
Repetição		F(2, 10)=1,6; p=,2	F(2, 10)=3,7; p=,06
Tratamento		F(1,10)=,6; p=,46	

Dados expressos em segundos, média ± EPM. ANOVA medidas repetidas com post-hoc de Duncan. * = diferença em relação ao controle, # = diferença em relação ao teste, T = teste, R1 = reteste 1, R2 = reteste 2

Tabela 5 - Frequências dos comportamentos dos ratos no TNF-r: efeitos dos fatores repetição e tratamento.

Categoria	Sessões	Machos	
		Ctrl n=6	FLX n=6
Imobilidade	T	5,7±1,5	3,3±1,5*
	R1	5,7±1,7	5,7±1,75#
	R2	6,7±2,2	1,2±1,2*#
Repetição		F(2,10)=,6; p=,56	F(2,10)=13,8;p=,001 Post-hoc: R1 p=0,02; R2 p=0,03
Tratamento		F(1,10)=20,2, p=,001 Post-hoc: T p=0,03; R2 p=0,00003	
Nado	T	6,7±1,9	5,2±1,2
	R1	7,3±2	5,5±1,8
	R2	5,3±1,2	5,7±1,7
Repetição		F(2,10)=1,5; p=,2	F(2,10)=,2; p=,7
Tratamento		F(1,10)=3,4, p=,09	
Escalada	T	5,5±1,2	4,3±1,5
	R1	4,3±1	3,5±1,2
	R2	5,7±0,8	4,5±2,2
Repetição		F(2,10)=2,3; p=,1	F(2, 10)=,7; p=,5
Tratamento		F(1,10)=4,6; p=,056	

Dados expressos em média ± EPM. ANOVA medidas repetidas com post-hoc de Duncan. * = diferença em relação ao controle; # = diferença em relação ao teste, T = teste, R1 = reteste 1, R2 = reteste 2.

Tabela 6 - Durações dos comportamentos das ratas no TNF-r: efeitos dos fatores repetição e tratamento.

Categoria	Sessões	Ctrl N=9	FLX 1mg/kg N=9	FLX 2,5mg/kg N=8	FLX 5mg/kg N=8
Imobilidade	T	28,3±27,1	20,1±29,7	27,7±40,1	29,4±24,7
	R1	62,4±71,8	28,9±37,4	95,7±69	73,6±53,7 [#]
	R2	47,4±60,4	30,9±35	68,1±64,3	54,5±44,4
Repetição		F(2,16)=1,9; p=,2	F(2,16)=,3; p=,7	F(2,14)=3,6; p=,052	F(2,14)=4,7; p=,02
Tratamento		F(3,30)=1,4, p=,2			
Nado	T	99,3±41,7	103,9±34,6	116±55,5	80,9±37,3
	R1	111,8±72,2	130,4±50,8	85,8±51,5	63,7±22,6
	R2	129,1±67,6	153,2±53,1 [#]	93,6±66,3	100,4±21,9
Repetição		F(2,16)=,6; p=,5	F(2,16)=7,8; p=,00	F(2,14)=,7; p=,49	F(2,14)=4,2; p=,03
Tratamento		F(3,30)=2,9; p=,049 Post-hoc: nenhuma significância com relação ao ctrl			
Escalada	T	110±48,3	117,3±38,8	96,4±42,5	134,4±47,2
	R1	66,2±36 [#]	84,6±43 [#]	60,9±35,1	106,5±65,8
	R2	56,7±23 [#]	60,8±43,1 [#]	77,3±62,4	90±52 [#]
Repetição		F(2,16)=6,5; p=,01	F(2,16)=17; p=,00	F(2,16)=17; p=,00	F(2,14)=4,9; p=,02
Tratamento		F(3,30)=1,2; p=,3			

Dados expressos em segundos, média ± EPM. ANOVA medidas repetidas com post-hoc de Duncan. [#] = diferença em relação ao teste, T = teste, R1 = reteste 1, R2 = reteste 2.

Tabela 7 - Frequências dos comportamentos das ratas no TNF-r: efeitos dos fatores repetição e tratamento.

Categoria	Sessões	Ctrl N=9	FLX 1mg/kg N=9	FLX 2,5mg/kg N=8	FLX 5mg/kg N=8
Imobilidade	T	2,1±2,4	1,8±1,7	1,7±1,9	3,1±2
	R1	2,9±4,7	2,1±2,6	3,1±2,6	5,1±2,5
	R2	2,8±2	2,4±2,7	4±2,7	3,7±2,3
Repetição		F(2,16)=3; p=,7	F(2,16)=3; p=,7	F(2,14)=1,8; p=,2	F(2,14)=3,1; p=,07
Tratamento		F(3,30)=1,2, p=,3			
Nado	T	7,5±3,7	7,5±2,6	7,7±3,4	5,4±1,9
	R1	4,9±2,7	7±2,7	7±2,9	5,9±1,5
	R2	8,9±3,4	7,3±2,8	8,7±2,7	5,9±1,9
Repetição		F(2,16)=3,5; p=,054	F(2,16)=1; p=,9	F(2,14)=,8; p=,46	F(2,14)=,2; p=,8
Tratamento		F(3,30)=2; p=,1			
Escalada	T	5±3,3	4,7±1,5	5,3±2,2	5,6±1,8
	R1	5,5±4	5,3±2	5±2,3	4,4±2,8
	R2	5,8±2	5,2±2,5	5,4±2,9	4±2,3
Repetição		F(2,16)=,2; p=,8	F(2,16)=,3; p=,7	F(2,14)=,05; p=,9	F(2,14)=1,3; p=,3
Tratamento		F(3,30)=,3; p=,8			

Dados expressos em média ± EPM. ANOVA medidas repetidas com post-hoc de Duncan. T = teste, R1 = reteste 1, R2 = reteste 2.

Tabela 8 - Durações dos comportamentos de ratos machos e fêmeas no TNF-r: efeitos dos fatores repetição e sexo.

Categoria	Sessões	Machos CTRL n=6	Fêmeas CTRL n=9	Machos FLX2,5 n=6	Fêmeas FLX2,5 n=8
Imobilidade	T	49,6±13,9	28,3±27,1	21,5±8,2	27,7±40,1
	R1	50,4±19,4	62,4±71,8	26,6±16,3	95,7±69 ^{&}
	R2	73,2±38,4	47,4±60,4	20,4±21,5	68,1±64,3
Repetição		F(2,10)=1,9, p=,2	F(2,16)=1,9, p=,2	F(2,10)=,3, p=,7	F(2,14)=3,6, p=,052
Sexo		F(1,13)=,3; p=,57		F(1,12)=5,2; p=,04 Post-hoc: R1 p=0,01	
Nado	T	83,5±17,3	99,3±41,7	96,1±37,2	116±55,5
	R1	115,1±16,9	111,8±72,2	124±32	85,8±51,5
	R2	77,6±42,4	129,1±67,6	140,3±26,4 [#]	93,6±66,3
Repetição		F(2,10)=2,2, p=,1	F(2,16)=,6, p=,6	F(2,10)=4,8, p=,03 Post-hoc: R2=0,01	F(2,14)=,7, p=,49
Sexo		F(1,13)=1,7; p=,2		F(1,12)=1,8, p=,2	
Escalada	T	112±24,4	110±48,3	135,5±45,1	96,4±42,5
	R1	79,7±24,1	66,2±36 [#]	90,7±34,6	60,9±35,1
	R2	88,9±37,3	56,7±23 [#]	86,5±46,1	77,3±62,4
Repetição		F(2,10)=1,6, p=,2	F(2,16)=6,5, p=,01 Post-hoc: R1=0,01; R2=0,005	F(2,10)=3,8, p=,06	F(2,14)=2,9, p=,1
Sexo		F(1,13)=1,9; p=,2		F(1,12)=1,6; p=,2	

Dados expressos em segundos, média ± EPM. ANOVA de 2 vias com medidas repetidas com post-hoc de Duncan. #= diferença em relação ao teste, &= diferença em relação ao macho com o mesmo tratamento, T = teste, R1 = reteste 1, R2 = reteste 2.

Tabela 9 - Frequências dos comportamentos de ratos de machos e fêmeas controle no TNF-r: efeitos dos fatores repetição e sexo.

Categoria	Sessões	Machos CTRL n=6	Fêmeas CTRL n=9	Machos FLX2,5 n=6	Fêmeas FLX2,5 n=8
Imobilidade	T	5,7±1,5	2,1±2,4 ^{&}	3,3±1,5	1,7±1,9
	R1	5,7±1,7	2,9±4,7	5,7±1,7 [#]	3,1±2,6
	R2	6,7±2,2	2,8±2 ^{&}	1,2±1,2 [#]	4±2,7
Repetição		F(2,10)=,6, p=,6	F(2,16)=,36, p=,7	F(2,10)=13, 9, p=,001 Post-hoc: R1= 0,02; R2= 0,03	F(2,14)=1,8, p=,2
Sexo		F(1,13)=7,9; p=,01 Post-hoc: T p=0,04; R2 p=0,024		F(1,12)=,4; p=,53	
Nado	T	6,7±1,9	7,5±3,7	5,2±1,2	7,7±3,4
	R1	7,3±2	4,9±2,7	5,5±1,8	7±2,9
	R2	5,3±1,2	8,9±3,4	5,7±1,7	8,7±2,7 ^{&}
Repetição		F(2,10)=1,5, p=,2	F(2,16)=3,5, p=,054	F(2,10)=,2, p=,8	F(2,14)=,8, p=,5
Sexo		F(1,13)=,7; p=,4		F(1,12)=6,5; p=,02 Post-hoc: R2 p=0,045	
Escalada	T	5,5±1,2	5±3,3	4,3±1,5	5,3±2,2
	R1	4,3±1	5,5±4	3,5±1,2	5±2,3
	R2	5,7±0,8	5,8±2	4,5±2,2	5,4±2,9
Repetição		F(2,10)=2,3, p=,1	F(2,16)=,2, p=,8	F(2,10)=,7, p=,5	F(2,14)=,05, p=,9
Sexo		F(1,13)=,08, p=,7		F(1,12)=1,9; p=,2	

Dados expressos em média ± EPM. ANOVA medidas repetidas com post-hoc de Duncan. [&]= diferença em relação ao macho com o mesmo tratamento, T = teste, R1 = reteste 1, R2 = reteste 2.

6.2. Metabolismo de 5-HT no cérebro de ratos machos e fêmeas

6.2.1. Experimento piloto:

A análise estatística por Kurskall-Wallis não revelou diferenças significativas, independente do sexo, ou tratamento (Tabela 10). Porém, devido ao pequeno número de amostras utilizadas para este experimento e a falta de grupos que nos mostrassem o basal destes animais, o ensaio foi repetido no Experimento neuroquímico.

6.2.2. Experimento Neuroquímico:

No córtex dos machos (n=5), o tratamento com FLX diminuiu significativamente a quantidade de 5-HT quando comparada ao veículo (ANOVA $p<0,001$; post-hoc $p=0,02$) (Figura 12, Tabela 11). O tratamento crônico com FLX causou um aumento significativo da razão 5-HIAA/5-HT nestes animais quando comparados ao grupo veículo (ANOVA $p<0,001$; post hoc $p<0,001$) (Figura 12, Tabela 11).

No córtex das fêmeas (n=5), o tratamento com FLX não afetou os parâmetros basais (Figura 12, Tabela 11). Observamos diferença sexual somente na concentração de 5-HT basal dos animais tratados com veículo (ANOVA $p<0,001$; post hoc $p=0,02$) (Figura 12, Tabela 11).

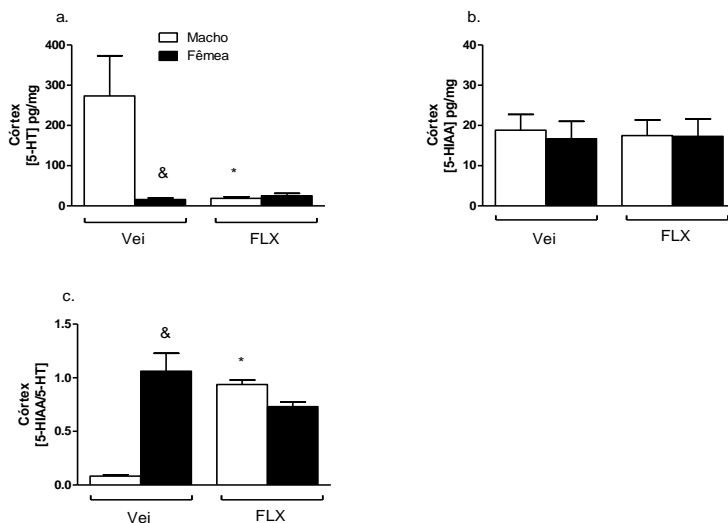


Figura 8: Concentrações de 5-HT e 5-HIAA basais, no córtex de ratos machos (n=5, barras brancas) ou fêmeas (n=5, barras pretas) tratados por via oral com veículo (Vei) ou fluoxetina 2,5 mg/kg (FLX). a) Concentração de 5-HT; b) Concentração de 5-HIAA; c) Razão 5-HIAA/5-HT. As barras representam a média + EPM. Os córtex dissecados dos cérebros dos animais foram incubados *in vitro* na ausência de 5-HT. * = significativamente diferente do veículo, & - significativamente diferente do macho. Anova de 1 via seguida do teste de Duncan, $p < 0.05$

No hipocampo dos ratos, o tratamento com FLX induz um aumento significativo da razão quando comparados com o basal (ANOVA $p < 0,001$; post-hoc $p < 0,001$) (Figura 13, Tabela 11).

No hipocampo das ratas, o tratamento crônico com FLX induz um aumento significativo da razão (ANOVA $p < 0,001$; post hoc $p < 0,001$) (Figura 13, Tabela 11).

Não observamos diferenças sexuais nesta área, independente do tratamento *in vivo*.

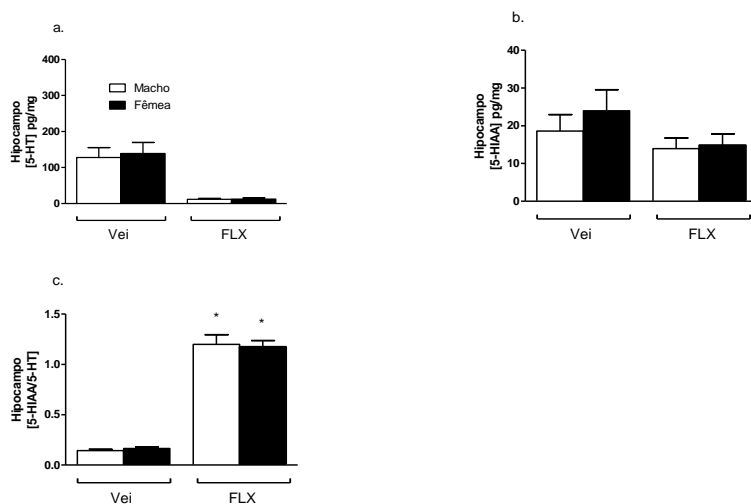


Figura 9: Concentrações de 5-HT e 5-HIAA basais, no hipocampo de ratos machos (n=5, barras brancas) ou fêmeas (n=5, barras pretas) tratados por via oral com veículo (Vei) ou fluoxetina 2,5 mg/kg (FLX). a) Concentração de 5-HT; b) Concentração de 5-HIAA; c) Razão 5-HIAA/5-HT. As barras representam a média + EPM. Os hipocampus dissecados dos cérebros dos animais foram incubados *in vitro* na ausência de 5-HT. * = significativamente diferente do veículo. Anova de 1 via seguida do teste de Duncan, $p < 0.05$

Para observarmos o efeito da incubação *in vitro* de 5-HT, foi feito o cálculo de % do basal – 100.

No córtex dos ratos, o tratamento crônico com FLX juntamente com a incubação com 5-HT, causou um aumento da % de 5-HT (ANOVA $p=0,02$; post hoc $p=0,01$) (Figura 14). A % de 5-HIAA não foi alterada. Já a % da razão foi significativamente diminuída nos animais que receberam tratamento crônico com FLX (ANOVA $p=0,03$; post hoc $p<0,001$) (Figura 14).

No córtex das ratas, nenhum parâmetro foi alterado, independente do tratamento *in vivo*.

As diferenças sexuais nesta região foram observadas na % de 5-HT dos animais veículo, sendo significativamente maior nas fêmeas (ANOVA $p=0,02$; post hoc $p=0,01$) (Figura 14), e na % da razão, sendo significativamente menor nas fêmeas quando

comparadas aos machos (ANOVA $p=0,03$; post hoc $p=0,00$) (Figura 14).

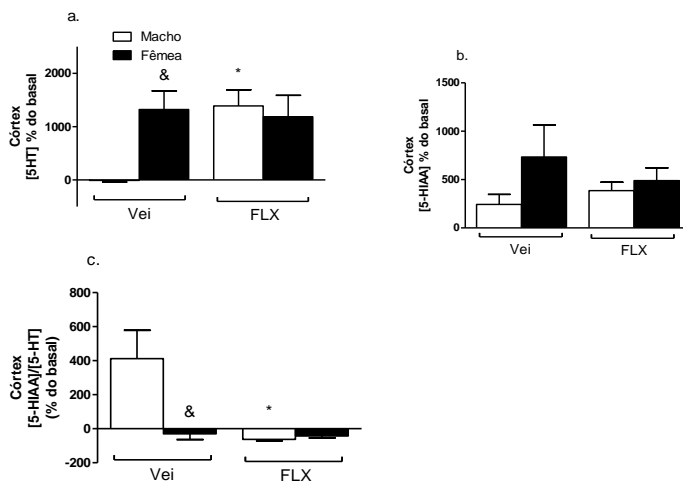


Figura 10: Concentrações de 5-HT e 5-HIAA, em porcentagem do basal, no córtex de ratos machos ($n=5$, barras brancas) ou fêmeas ($n=5$, barras pretas) tratados por via oral com veículo (Vei) ou fluoxetina 2,5 mg/kg (FLX). A razão entre as concentrações de 5-HIAA e 5-HT é expressa em (% do basal – 100). a) Concentrações de 5-HT em % do basal; b) Concentrações de 5-HIAA em % do basal; c) Razões 5-HT/5-HIAA em % do basal. As barras representam a média + EPM. Os córtex dissecados dos cérebros dos animais foram incubados *in vitro* na presença ou ausência (basal) de 5-HT. * = significativamente diferente do veículo, & = significativamente diferente do macho. Anova de 1 via seguida do teste de Duncan, $p < 0.05$.

No hipocampo dos ratos, o tratamento crônico com FLX, juntamente com a incubação, causou um aumento da % de 5-HT (ANOVA $p < 0,001$; post hoc $p < 0,001$) (Figura 15). A % de 5-HIAA não foi alterada, independente o tratamento *in vivo*. Já a % da razão foi significativamente diminuída nos animais que receberam tratamento crônico com FLX (ANOVA $p < 0,001$; post hoc $p < 0,001$) (Figura 15).

No hipocampo das ratas, o tratamento crônico com FLX, juntamente com a incubação, causou um aumento da % de 5-HT (ANOVA $p = 0,00$; post hoc $p = 0,00$) (figura 15). A % de 5-HIAA não foi alterada, independente o tratamento *in vivo*. A % da razão foi significativamente diminuída nos animais que receberam

tratamento crônico com FLX (ANOVA $p=0,00$; post hoc $p=0,00$) (Figura 15).

Nesta região não foram observadas diferenças sexuais, independente do tratamento *in vivo*.

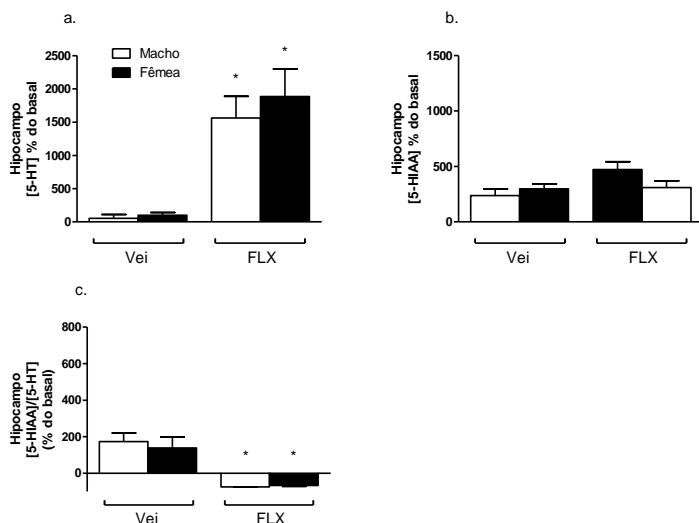


Figura 11: Concentrações de 5-HT e 5-HIAA, em porcentagem do basal, no hipocampo de ratos machos ($n=5$, barras brancas) ou fêmeas ($n=5$, barras pretas) tratados por via oral com veículo (Vei) ou fluoxetina 2,5 mg/kg (FLX). A razão entre as concentrações de 5-HIAA e 5-HT é expressa em (% do basal - 100). a) Concentrações de 5-Ht em % do basal; b) Concentrações de 5-HIAA em % do basal; c) Razões 5-HT/5-HIAA em % do basal. As barras representam a média + EPM. Os hipocampus dissecados dos cérebros dos animais foram incubados *in vitro* na presença ou ausência (basal) de 5-HT. * = significativamente diferente do veículo, & = significativamente diferente do macho. Anova de 1 via seguida do teste de Duncan, $p < 0.05$.

Tabela 10 - Concentrações de 5-HT e 5-HIAA e razão 5-HIAA/5-HT em diferentes regiões do cérebro de ratos machos e fêmeas para o experimento piloto.

		Machos		Fêmeas	
Região		Veículo N=3	FLX N=5	Veículo N=3	FLX N=5
Hipocampo	5-HT	131,6±20,4	109,8±11,2	79,3±8,1	87,6±15,9
	5-HIAA	51,1±3,8	48,9±5,3	60,5±5,6	54,9±12,6
	5-HIAA/ 5-HT	0,4±0,1	0,5±0,1	0,8±0,02	0,9±0,5
Tronco encefálico	5-HT	75±13,5	146,7±89,8	46,7±9	43,3±9,3
	5-HIAA	26,2±6,8	12,8±3,1	18,2±6,8	15,8±2,5
	5-HIAA/ 5-HT	0,3±0,04	0,2±0,1	0,4±0,1	0,5±0,2
Córtex frontal	5-HT	86,7±14,3	221,4±142, 7	104,5± 31,8	82,9±17,9
	5-HIAA	43,9±8,04	29,8±5,4	43,3± 8,9	39,9±10,5
	5-HIAA/ 5-HT	0,5±0,03	0,3±0,1	0,5±0,1	0,6±0,2
Cerebelo	5-HT	62,9±11,4	141,8±68,3	147,3± 91,02	59±10,2
	5-HIAA	10,6±3,4	15,4±1,9	23,6± 12,6	15,2±1
	5-HIAA/ 5-HT	0,2±0,04	0,2±0,1	0,2±0,02	0,3±0,04

Abreviações: 5-HT = Serotonina; 5-HIAA = Ácido 5-hidróxiindol acético; FLX= Fluoxetina 2,5 mg/kg

Tabela 11 - Concentrações de 5-HT e 5-HIAA e razão 5-HIAA/5-HT em diferentes regiões do cérebro de ratos machos e fêmeas para o experimento 1.

Sexo	Tratamento	Córtex Frontal			Hipocampo		
		5-HT N=5	5- HIAA N=5	Razão N=5	5-HT N=5	5- HIAA N=5	Razão N=5
Macho	V+V	273,6 ±100	18,9 ±3,9	0,1±0	127,4 ±27,4	18,6 ±4,4	0,1±0
	V+5-HT	223,7 ±82,6	65,5 ±25,2	0,5±0,2	186,5 ±79,3	55,2 ±12,6	0,4±0,1
	FLX+V	18,9 ±4	17,5 ±3,9	0,9±0	11,9 ±2,4	13,9 ±2,8	1,2±0,1
	FLX +5-HT	260,2 ±79,1	84 ±22	0,3±0	168,8 ±28,7	52,4 ±11,2	0,3±0
Fêmea	V+V	16,1 ±3,6	16,7 ±4,4	1,1±0,1	139,1 ±30,7	24 ±5,6	0,1±0
	V+5-HT	228,6 ±60,1	122,8 ±40,9	0,5±0,1	305,6 ±80,4	96 ±27,4	0,4±0,1
	FLX+V	24,9 ±6,3	17,3 ±4,25	0,7±0	12,6 ±2,7	14,8 ±3	1,2±0,1
	FLX +5-HT	259,7 ±94,5	87,4 ±24,1	0,4±0,1	224,8 ±59,7	79 ±16,9	0,4±0,1

5-HIAA= Ácido 5-hidróxiindol acético; 5-HT= Serotonina; FLX= fluoxetina; V= veículo

Observamos que há correlação significativa entre as durações dos comportamentos no reteste 2 e as concentrações de 5-HT e 5-HIAA medidas nos tecidos ao final do TNFr (Tabelas 12 e 13). As concentrações intracelulares de 5-HT e 5-HIAA no córtex das ratas tratadas com fluoxetina se correlacionam positivamente com a duração de imobilidade, ou seja, quanto maior o tempo de imobilidade maior a concentração de 5-HT e 5-HIAA. Neste mesmo grupo de ratas, a razão 5-HIAA/5-HT se correlaciona negativamente com a duração de imobilidade e positivamente com a duração de escalada, ou seja, quanto maior a razão menor a duração de imobilidade e maior a duração de escalada. As demais correlações não foram significantes.

Tabela 12 - Correlação entre os comportamentos no reteste 2 com as concentrações cerebrais de 5-HT 5-HIAA de ratos.

		Córtex			Hipocampo		
		5-HT	5-HIAA	Razão	5-HT	5-HIAA	Razão
Macho V-V	Imob	-0,08	-0,72	-0,44	-0,62	-0,74	-0,68
	Nado	0,53	0,68	-0,17	0,71	0,49	-0,10
	Esc	-0,66	-0,19	0,74	-0,31	0,08	0,75
Macho V-5HT	Imob	-0,23	-0,53	-0,60	-0,02	-0,54	-0,52
	Nado	-0,08	-0,29	0,65	0,30	0,42	0,40
	Esc	0,11	0,67	-0,02	-0,48	-0,13	0,19
Macho FLX-V	Imob	-0,64	-0,74	-0,30	-0,28	-0,22	0,21
	Nado	0,33	0,43	0,38	-0,10	0,06	0,30
	Esc	0,57	0,58	-0,12	0,59	0,34	-0,60
Macho FLX-5HT	Imob	0,04	-0,14	-0,47	-0,64	-0,53	-0,03
	Nado	0,15	0,28	0,05	0,60	0,65	0,24
	Esc	-0,17	-0,05	0,65	0,26	0,06	-0,16

5-HIAA = ácido 5-hidróxindolacético; 5-HTT = serotonina V – V = animal tratado com veículo *in vivo* com veículo *in vitro*; V – 5HT = animal tratado com veículo *in vivo* e com veículo *in vitro*; FLX – V = animal tratado *in vivo* com fluoxetina 2,5mg/Kg e *in vitro* com veículo; FLX – 5HTT = animal tratado *in vivo* com fluoxetina e *in vitro* com 5-HT.

Tabela 13 - Correlação entre os comportamentos no reteste 2 com as concentrações cerebrais de 5-HT 5-HIAA de ratas.

		Córtex			Hipocampo		
		5-HT	5-HIAA	Razão	5-HT	5-HIAA	Razão
Fêmea V-V	Imob	0,39	-0,05	-0,36	0,59	0,47	0,03
	Nado	-0,22	0,07	0,26	-0,26	-0,17	0,08
	Esc	-0,45	0,01	0,33	-0,82	-0,69	-0,18
Fêmea V-5HT	Imob	0,75	0,73	0,33	0,04	0,37	-0,02
	Nado	-0,56	-0,52	-0,22	0,30	-0,26	-0,37
	Esc	-0,71	-0,70	-0,34	-0,52	-0,36	0,60
Fêmea FLX-V	Imob	0,95*	0,90*	-0,88*	0,60	0,81	0,79
	Nado	-0,24	-0,37	-0,40	-0,08	0,01	0,25
	Esc	-0,62	-0,50	0,93	-0,54	-0,73	-0,70
Fêmea FLX-5HT	Imob	0,11	0,25	0,29	0,53	0,65	0,35
	Nado	0,29	0,11	-0,78	-0,21	-0,10	0,38
	Esc	-0,41	-0,42	0,31	-0,36	-0,55	-0,49

5-HIAA = ácido 5-hidróxindolacético; 5-HTT = serotonina V - V = animal tratado com veículo *in vivo* com veículo *in vitro*; V - 5HT = animal tratado com veículo *in vivo* e com veículo *in vitro*; FLX - V = animal tratado *in vivo* com fluoxetina 2,5mg/Kg e *in vitro* com veículo; FLX - 5HTT = animal tratado *in vivo* com fluoxetina e *in vitro* com 5-HT. * - correlação significante $p < 0,05$

7. Discussão

7.1. Os comportamentos dos ratos machos e fêmeas no TNF-r e a contribuição do dimorfismo sexual para as respostas comportamentais ao estresse.

De uma maneira geral, ratos machos e fêmeas veículo tendem a fazer os mesmos comportamentos ao longo das exposições. Com relação à repetição, vemos que os ratos tendem a demonstrar um aumento gradativo, apesar de não significativo, da duração de imobilidade, assim como as fêmeas. Ainda para os ratos, observamos que o tratamento com FLX 2,5mg/Kg impediu este aumento de imobilidade, que foi refletido no aumento significativo da duração de nado no reteste 2. Já para as ratas, não vemos efeito da repetição, independente do tratamento. Em relação ao tratamento, além de todas as doses terem falhado em diminuir a duração de imobilidade de modo significativo, ainda causaram o efeito contrário, ou seja, o aumento da duração de imobilidade, como pode ser observado na Figura 6 - b, que apesar de não significativa, não pode ser ignorada.

No experimento piloto, a repetição do teste nos ratos não afetou significativamente nenhum parâmetro comportamental, enquanto que em fêmeas a frequência de nado aumentou com a repetição do teste. No experimento comportamental nenhum parâmetro comportamental foi afetado pela repetição em ratos machos ou fêmeas evidenciando que o aumento da frequência de nado observado no experimento piloto foi um achado fortuito. Em trabalhos anteriores foi observado o aumento da duração de imobilidade de ratos (MEZADRI *et al.*, 2011; POSSAMAI *et al.*, 2015) nos retestes 1 e 2 quando comparados ao teste, enquanto que nas ratas não houve aumento significativo do tempo de imobilidade, mas observa-se uma leve tendência de ocorrer este aumento somente no reteste 1 (LINO DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). Nestes trabalhos (POSSAMAI *et al.*, 2015; LINO DE OLIVEIRA *et al.*, 2015) os efeitos da repetição sobre a duração da imobilidade foram atenuados pelo alojamento dos animais em ambiente enriquecido. Por esta razão, atribuímos a ausência dos efeitos da repetição sobre o comportamento dos ratos machos e fêmeas no presente estudo ao fato dos animais terem sido tratados com a sacarose.

A sacarose, por ser um estímulo apetitivo (ULRICH-LAI; OSTRANDER; HERMAN, 2011) pode ter diminuído o efeito estressante do teste por ativação do sistema de recompensa (RAMIREZ *et al.*, 2015).

7.2. Resposta comportamental de ratos machos e fêmeas ao tratamento com FLX: comparações com o teste de Porsolt

No experimento comportamental, com o ajuste da porcentagem de sacarose e a suposta eliminação do sabor

desagradável podemos observar o efeito da FLX em diminuir a imobilidade dos ratos no reteste 2 como já havia sido relatado anteriormente (MEZADRI *et al.*, 2011; POSSAMAI *et al.*, 2015), porém também ocorreu uma diminuição de imobilidade inesperada no teste. Não foi encontrado relato na literatura de efeito do tratamento agudo com a dose de FLX 2,5mg/kg de diminuição da imobilidade no teste de Porsolt. Assim, sugerimos que o efeito observado aqui poderia ser decorrente de uma interação do efeito do fármaco com o da sacarose (ULRICH-LAI; OSTRANDER; HERMAN, 2011).

Para as ratas, não foi observado o efeito esperado de diminuição de imobilidade causada pelo tratamento sobre as variáveis medidas no TNF-r, independentemente da dose utilizada. Isto está em linha com os resultados encontrados por Lifschytz *et al.* (2006) e Mitic *et al.* (2013) que também não observaram o efeito da FLX na dose de 5mg/Kg em fêmeas. Porém, Estrada-Camarena *et al.* (2011) encontraram efeito de redução da imobilidade em fêmeas tratadas com FLX, independente da dose. No entanto, neste estudo as fêmeas utilizadas eram ovariectomizadas, o que pode ser um fator que explique o efeito encontrado. O estudo de Li *et al.* (2014) mostrou que a ovariectomia *per se* é um fator que aumenta o tempo de imobilidade das fêmeas, deste modo, pode ser que o efeito dos fármacos antidepressivos de reduzir este comportamento se mostre mais evidente.

Esta falta do efeito de diminuição de imobilidade causada pelo tratamento com FLX em fêmeas pode ser devido a um efeito farmacodinâmico, ou seja, diferenças sexuais no alvo farmacológico da FLX, o SERT. De fato, fêmeas mostram uma maior capacidade de captação de 5-HT quando desafiadas com 5-HT exógena, em estudo *in vitro* utilizando vasos sanguíneos (LINDER *et al.*, 2011), sendo essa capacidade de recaptação altamente dependente do SERT.

Essa falta de efeito também pode ser explicada por diferenças farmacocinéticas, como diferenças sexuais no metabolismo ou absorção do fármaco. Isto parece acontecer em humanos, onde mulheres idosas metabolizam menos fluoxetina quando comparadas com homens da mesma idade (FERGUSON E HILL, 2006)

Em relação ao dimorfismo comportamental dos animais no teste do nado forçado repetido, vimos que não houve diferença

entre os animais tratados somente com sacarose. Mas, quando analisamos os animais tratados com FLX 2,5mg/Kg, a duração de imobilidade aumentada observada nas ratas no reteste 2, pode ser simplesmente pelo efeito de redução deste parâmetro nos machos, e a falta de efeito nas fêmeas.

7.3. Metabolismo de 5-HT no cérebro de ratos machos e fêmeas

No experimento neuroquímico ficou claro que os tecidos que continham baixos níveis basais de 5-HT puderam captar mais 5-HT exógena. Isto foi observado tanto no córtex quanto no hipocampo de ratos machos e fêmeas. Estes dados indicam que as concentrações basais de 5-HT no tecido podem afetar sua capacidade de captação de 5-HT exógena. Em contrapartida o córtex dos ratos tratados com veículo, apresentou maiores níveis de 5-HT, e a incubação com 5HT exógena não alterou os níveis intracelulares de 5-HT. No entanto, houve aumento do metabolismo, mostrando que a serotonina que está sendo recaptada, está sendo prontamente metabolizada. O aumento do valor da razão 5-HIAA/5-HT indica a atividade dos neurônios serotoninérgicos (SHANNON, GUNNET E MOORE, 1986) e neste caso indicaria um aumento da atividade serotoninérgica no hipocampo de ratos machos e fêmeas e no córtex dos machos.

Quando tratadas com veículo, as ratas apresentam menores níveis de 5-HT no córtex, quando comparadas aos machos. Diferenças nos níveis de 5-HT também foram encontradas em outras regiões encefálicas, como a amígdala basolateral (MITSUSHIMA, *et al.*, 2006).

No hipocampo, os valores basais de 5-HT são semelhantes entre ratos machos e fêmeas. Essa discrepância é possível, visto que o córtex e hipocampo são alvos de projeções de núcleos distintos da rafe, sendo que o hipocampo recebe projeções serotoninérgicas principalmente originadas do núcleo mediano, enquanto o córtex é alvo de projeções, principalmente, do núcleo dorsal. (AZMITIA AND SEGAL, 1978; DEAKIN; GRAEFF, 1991; GRAEFF *et al.*, 1996).

Surpreendentemente, apesar das diferenças neuroquímicas, o comportamento destes animais no TNF-r não difere. Os dados aqui presentes, mostram que ratos tratados com FLX apresentam uma diminuição dos níveis intracelulares de 5-HT tanto no córtex quanto no hipocampo. Isso primeiramente sugere que o transportador foi bloqueado pelo tratamento com o fármaco. Porém, essa diminuição da recaptação não pode ser

observada no córtex de ratas tratadas com FLX, mas foi observada no hipocampo destes animais. Uma vez que o tratamento com FLX reduz os níveis intracelulares de 5-HT no hipocampo de ratas, é possível que a FLX tenha bloqueado o SERT. Ainda, quando incubado com 5-HT exógena, o córtex foi capaz de captar a 5-HT do meio (Figura 14 – a).

Apesar da razão 5-HIAA/5-HT ser maior nessas fêmeas, a falta de aumento da concentração bruta de 5-HIAA após a incubação com 5-HT exógena parece descartar uma maior atividade da MAO. Porém, aparentemente, o metabolismo deste neurotransmissor parece ser maior em fêmeas, uma vez que estas mantêm os níveis de 5-HIAA semelhantes aos machos embora apresentem menos 5-HT basal. Dessa maneira, podemos concluir que a atividade serotoninérgica, que é diretamente relacionada com a razão 5-HT/5-HIAA (SHANNON, GUNNET E MOORE, 1986) nesta área está aumentada nas fêmeas

A redução dos níveis intracelulares de 5-HT observada em ambas as regiões analisadas dos machos tratados com FLX, e no hipocampo de fêmeas com o mesmo tratamento, pode ser devido ao aumento extracelular de 5-HT causado pelo tratamento crônico com ISRS (CELLADA; ARTIGAS; 1993, HERVÁS; ARTIGAS, 1998). Outra alternativa seria a redução da autorregulação negativa causada pela dessensibilização dos receptores 5-HT_{1a} pré-sinápticos após o tratamento crônico com o fármaco (HERVÁS; ARTIGAS, 1998, ARTIGAS, ADELL, CELLADA, 2006). Porém, no córtex das fêmeas o tratamento crônico não reduziu a concentração de 5-HT intracelular. Quando o córtex das ratas foi incubado com 5-HT exógena, a quantidade intracelular de 5-HT atinge concentrações semelhantes a dos machos. Estes dados sugerem que, apesar do efeito comportamental do tratamento ser antagonístico entre os sexos, a funcionalidade do SERT parece ser semelhante.

Ao analisarmos a correlação que os dados comportamentais teriam com os dados neuroquímicos (tabelas 12 e 13) a atividade dos neurônios serotoninérgicos (indicada pela razão 5-HIAA/5-HT) das ratas tem correlação negativa com a duração de imobilidade e positiva com a duração de escalada. Isto sugere que a atividade serotoninérgica é aumentada no córtex das ratas mais móveis, independente do tratamento com o antidepressivo. É interessante notar que o aumento da atividade serotoninérgica no córtex inibe os neurônios piramidais

(ARANEDA E ANDRADE, 1991). A inibição cortical pode reduzir imobilidade no TNF (SLATTERY, NEUMANN E CRYAN, 2011). Essas evidências, somadas aos dados aqui apresentados parecem sugerir que, pelo menos para ratos, o aumento da ativação serotoninérgica promovido pelo tratamento crônico com FLX atuaria em receptores pós-sinápticos inibitórios do tipo 5-HT_{1A} (SHANNON, GUNNET E MOORE, 1986) presentes no córtex, de forma a inibir sua atividade promovendo assim a diminuição da imobilidade observada no TNF-R.

Uma vez que o aumento da atividade serotoninérgica cortical nas ratas não promoveu uma diminuição da imobilidade no TNF-R, é possível especular que o perfil de expressão dos receptores 5-HT_{1A} no córtex desses animais seja diferente ao dos machos. O alto nível de ativação serotoninérgica basal (indicada pela razão 5-HIAA/5-HT alta) encontrado nas ratas poderia promover uma maior internalização desses receptores, inativando-os (HERVÁS; ARTIGAS, 1998, ARTIGAS, ADELL, CELLADA, 2006). A inativação dos receptores inibitórios no córtex das ratas poderia dessensibiliza-lo aos efeitos inibitórios promovidos pelo aumento da serotonina. Deste modo o tratamento com o antidepressivo, apesar de manter alta a atividade serotoninérgica, não produziria a inibição cortical necessária para que ocorra a redução da imobilidade de ratas no TNF-r.

No entanto, vale ressaltar que no experimento comportamental o tratamento produziu um aumento da imobilidade das fêmeas tratadas com FLX, apesar de não significativa, que se refletiu na diminuição da escalada. Sendo assim, mais evidências se fazem necessárias para investigar os possíveis mecanismos regulatórios atuando a nível cortical, que teriam como reflexo a diferença comportamental observada após o tratamento crônico com FLX.

8. Conclusão

Os dados aqui encontrados para o comportamento dos machos corroboram com o que se encontra na literatura, e com o trabalho anterior de nosso laboratório, reforçando a validade deste teste para estes animais.

Já para as ratas, a FLX não parece exercer seu efeito de redução de imobilidade como já está estabelecido para os machos. Levando em consideração também os resultados encontrados no experimento neuroquímico, podemos dizer que, o metabolismo de 5-HT cortical das ratas veículo se encontra aumentado, levando a uma pequena concentração intracelular de 5-HT. Os dados do hipocampo destes animais nos sugerem que o tratamento com FLX parece ter sido efetivo.

A incubação *in vitro* com 5-HT mostrou que a MAO cortical das ratas não está hiperativada. Deste modo, o maior metabolismo observado para estes animais a nível basal não é consequência de uma superativação da MAO.

Como conclusão geral, podemos dizer que o modelo comportamental aqui apresentado é confiável para detecção de antidepressivos monoaminérgicos em ratos machos. Porém, a aplicação do TNF- α em fêmeas com gônadas íntegras ainda não é recomendado, por poder gerar resultados “falsos negativos”.

Deste modo, mais estudos se fazem necessários para investigar essas diferenças.

9. Referências

- ABDEL-SATER, K. A.; ABDEL-DAIEM, W. M.; BAKHEET, M. S. The gender difference of selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine in adult rats with stress-induced gastric ulcer. **European Journal of Pharmacology**, v. 688, n. 1, p. 42-48, 2012.
- ANDREWS, P. W.; BHARWANI, A.; LEE, K. R.; FOX, M.; THOMSON, J. A. Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 51, p. 164-188, 2015.
- ANTYPA, Niki; SERRETTI, Alessandro; RUJESCU, Dan. Serotonergic genes and suicide: A systematic review. **European Neuropsychopharmacology**, [s.l.], v. 23, n. 10, p.1125-1142, out. 2013. Elsevier BV.
- ARANEDA, R.; ANDRADE, R. 5-Hydroxytryptamine 2 and 5-hydroxytryptamine 1A receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. **Neuroscience**, v. 40, n. 2, p. 399-412, 1991.
- ARTIGAS, F.; ADELL, A.; CELADA, P. Pindolol augmentation of antidepressant response. **Current Drug Targets**, v. 7, n. 2, p. 139-147, 2006.
- AZMITIA, Efrain C.; SEGAL, Menahem. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 179, n. 3, p. 641-667, 1978.
- BAUER, Elizabeth P.. Serotonin in fear conditioning processes. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 277, p.68-77, jan. 2015. Elsevier BV.
- BELZUNG, C. Innovative Drugs to Treat Depression: Did Animal Models Fail to Be Predictive or Did Clinical Trials Fail to Detect Effects&quest. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 5, p. 1041-1051, 2014.
- BENMANSOUR, S.; WEAVER, R. S.; BARTON, A. K.; ADENIJI, O. S.; FRAZER, A. Comparison of the effects of estradiol and progesterone on serotonergic function. **Biological Psychiatry**, v. 71, n. 7, p. 633-641, 2012.
- CANTRELL, R.; GILLESPIE, W.; ALTSHULER, L. Fluoxetine and sertraline dosages in major depression. **Depression and Anxiety**, v. 9, n. 2, p. 78-82, 1999.
- CARRIER, N.; KABBAJ, M. Sex differences in the antidepressant-like effects of ketamine. **Neuropharmacology**, v. 70, p. 27-34, 2013.
- CARVILLE, S. F.; ARENDT-NIELSEN, S.; BLIDDAL, H.; BLOTMAN, F.; BRANCO, J.; BUSKILA, D.; DA SILVA, J.; DANNESKIOLD-SAMSØE, B.; DINCER, F.; HENRIKSSON, C. EULAR evidence-based recommendations for the management of fibromyalgia syndrome. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, n. 4, p. 536-541, 2008.

CELADA, P.; ARTIGAS, F. Monoamine oxidase inhibitors increase preferentially extracellular 5-hydroxytryptamine in the midbrain raphe nuclei. A brain microdialysis study in the awake rat. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 347, n. 6, p. 583-590, 1993.

CHASE, T N; MURPHY, D L. Serotonin and Central Nervous System Function. **Annu. Rev. Pharmacol.**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.181-197, abr. 1973. Annual Reviews.

COLLINS, Francis S.; TABAK, Lawrence A. NIH plans to enhance reproducibility. **Nature**, v. 505, n. 7485, p. 612, 2014.

CRAFT, R.; KOSTICK, M.; ROGERS, J.; WHITE, C.; TSUTSUI, K. Forced swim test behavior in postpartum rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 96, n. 4, p. 402-412, 2010.

CRISPIM JUNIOR, C. F.; PEDERIVA, C. N.; BOSE, R. C.; GARCIA, V. A.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; MARINO-NETO, J. ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. **Computers in Biology and Medicine**, v. 42, n. 2, p. 257-264, 2012.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238-245, 2002.

CRYAN, J. F.; PAGE, M. E.; LUCKI, I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. **Psychopharmacology**, v. 182, n. 3, p. 335-344, 2005.

DE OLIVEIRA, R. A.; CUNHA, G. M.; BORGES, K. D. M.; DE BRUIN, G. S.; DOS SANTOS-FILHO, E. A.; VIANA, G. S.; DE BRUIN, V. M. The effect of venlafaxine on behaviour, body weight and striatal monoamine levels on sleep-deprived female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 79, n. 3, p. 499-506, 2004.

DE VRY, J.; MAUREL, S.; SCHREIBER, R.; DE BEUN, R.; JENTZSCH, K. Comparison of hypericum extracts with imipramine and fluoxetine in animal models of depression and alcoholism. **European Neuropsychopharmacology**, v. 9, n. 6, p. 461-468, 1999.

DEAKIN, J. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of Psychopharmacology**, 1991.

DETKE, M. J.; JOHNSON, J.; LUCKI, I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 5, n. 2, p. 107, 1997.

DETKE, M. J.; LUCKI, I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. **Behavioural Brain Research**, v. 73, n. 1, p. 43-46, 1995.

ENRÍQUEZ-CASTILLO, A.; ALAMILLA, J.; BARRAL, J.; GOURBIÈRE, S.; FLORES-SERRANO, A. G.; GÓNGORA-ALFARO, J. L.; PINEDA, J. C. Differential effects of caffeine on the antidepressant-like effect of amitriptyline in female rat subpopulations with low and high immobility in the forced swimming test. **Physiology & Behavior**, v. 94, n. 3, p. 501-509, 2008.

ESTRADA-CAMARENA, E.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; HERNÁNDEZ-ARAGÓN, A.; MEJÍA-MAURIES, S.; PICAZO, O. Long-term ovariectomy modulates the antidepressant-like action of estrogens, but not of antidepressants. **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, n. 10, p. 1365-1377, 2011.

ESTRADA-CAMARENA, E.; RIVERA, N. V.; BERLANGA, C.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A. Reduction in the latency of action of antidepressants by 17 β -estradiol in the forced swimming test. **Psychopharmacology**, v. 201, n. 3, p. 351-360, 2008.

FERGUSON, J. M.; HILL, H. Pharmacokinetics of fluoxetine in elderly men and women. **Gerontology**, v. 52, n. 1, p. 45-50, 2006.

FLORES-SERRANO, A. G.; VILA-LUNA, M. L.; ÁLVAREZ-CERVERA, F. J.; HEREDIA-LÓPEZ, F. J.; GÓNGORA-ALFARO, J. L.; PINEDA, J. C. Clinical doses of citalopram or reboxetine differentially modulate passive and active behaviors of female Wistar rats with high or low immobility time in the forced swimming test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 110, p. 89-97, 2013.

GAYNES, B. N.; WARDEN, D.; TRIVEDI, M. H.; WISNIEWSKI, S. R.; FAVA, M.; RUSH, A. J. What did STAR* D teach us? Results from a large-scale, practical, clinical trial for patients with depression. **Psychiatric Services**, v. 60, n. 11, p. 1439-1445, 2009.

GOEL, N.; INNALA, L.; VIAU, V. Sex differences in serotonin (5-HT) 1A receptor regulation of HPA axis and dorsal raphe responses to acute restraint. **Psychoneuroendocrinology**, v. 40, p. 232-241, 2014.

GÓMEZ, M.; MARTINEZ-MOTA, L.; ESTRADA-CAMARENA, E.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A. Influence of the brain sexual differentiation process on despair and antidepressant-like effect of fluoxetine in the rat forced swim test. **Neuroscience**, v. 261, p. 11-22, 2014.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S.; DE ANDRADE, T. G.; DEAKIN, J. F. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 129-141, 1996.

GRAY, V. C.; HUGHES, R. N. Drug-, dose- and sex-dependent effects of chronic fluoxetine, reboxetine and venlafaxine on open-field behavior and spatial memory in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 281, p. 43-54, 2015.

GUIMARÃES, Francisco Silveira. Medicamentos utilizados no tratamento dos transtornos afetivos. In: GRAEFF, Frederico Guilherme; GUIMARÃES, Francisco Silveira. **Fundamentos da Psicofarmacologia**. 2. ed. Ribeirão Preto: Atheneu, 2012. Cap. 6. p. 121-164.

HAMMERSLAG, L. R.; GULLEY, J. M. Age and sex differences in reward behavior in adolescent and adult rats. **Developmental Psychobiology**, v. 56, n. 4, p. 611-621, 2014.

HERVÁS, I.; ARTIGAS, F. Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 358, n. 1, p. 9-18, 1998.

HILLHOUSE, T. M.; PORTER, J. H. A brief history of the development of antidepressant drugs: From monoamines to glutamate. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 1, 2015.

HONIG, G.; JONGSMA, M. E.; VAN DER HART, M.; TECOTT, L. H. Chronic citalopram administration causes a sustained suppression of serotonin synthesis in the mouse forebrain. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e6797-e6797, 2009.

KOKRAS, N.; ANTONIOU, K.; MIKAIL, H.; KAFETZOPOULOS, V.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z.; DALLA, C. Forced swim test: What about females? **Neuropharmacology**, 2015.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008.

LI, L.-H.; WANG, Z.-C.; YU, J.; ZHANG, Y.-Q. Ovariectomy results in variable changes in nociception, mood and depression in adult female rats. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94312, 2014.

LI, Y.; RAABY, K. F.; SANCHEZ, C.; GULINELLO, M. Serotonergic receptor mechanisms underlying antidepressant-like action in the progesterone withdrawal model of hormonally induced depression in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 256, p. 520-528, 2013.

LIFSCHYTZ, T.; SHALOM, G.; LERER, B.; NEWMAN, M. E. Sex-dependent effects of fluoxetine and triiodothyronine in the forced swim test in rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 2, p. 115-121, 2006.

LINDE, K.; KRISTON, L.; RÜCKER, G.; JAMIL, S.; SCHUMANN, I.; MEISSNER, K.; SIGTERMAN, K.; SCHNEIDER, A. Efficacy and acceptability of pharmacological treatments for depressive disorders in primary care: Systematic review and network meta-analysis. **The Annals of Family Medicine**, v. 13, n. 1, p. 69-79, 2015.

LINDER, A. E.; DAVIS, R. P.; BURNETT, R.; WATTS, S. W. Function of the Serotonin Transporter in Vasculature of the Female Rat: comparison with the male. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 38, n. 5, p. 314, 2011.

LINO-DE-OLIVEIRA, C.; POLI A.; LINDER, A.E.; MARINO-NETO, J.; CHRISTIAN, F.B.L.; SPEZIA, I.; THEINDL, L.C.; MELLEU, F.F.; DOMINGUES, K. Sexually dimorphic effects of fluoxetine in the repeated forced swimming test: the contribution of the serotonergic metabolism in the brain. In: 11th Göttingen Meeting, 2015, Göttingen. **Annals of the 11th Göttingen Meeting**, 2015.

LUO, J.; WANG, T.; LIANG, S.; HU, X.; LI, W.; JIN, F. Experimental gastritis leads to anxiety-and depression-like behaviors in female but not male rats. **Behav Brain Funct**, v. 9, p. 46, 2013.

MALBERG, Jessica E. et al. Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus. **The Journal Of Neuroscience**, v. 24, n. 20, p.9104-9110, 2000

MARCONDES, F.; BIANCHI, F.; TANNO, A. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

MARCUS, S. M.; KERBER, K. B.; RUSH, A. J.; WISNIEWSKI, S. R.; NIERENBERG, A.; BALASUBRAMANI, G.; RITZ, L.; KORNSTEIN, S.; YOUNG, E. A.; TRIVEDI, M. H. Sex differences in depression symptoms in treatment-seeking adults: confirmatory analyses from the Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression study. **Comprehensive Psychiatry**, v. 49, n. 3, p. 238-246, 2008.

MARCUS, S. M.; YOUNG, E. A.; KERBER, K. B.; KORNSTEIN, S.; FARABAUGH, A. H.; MITCHELL, J.; WISNIEWSKI, S. R.; BALASUBRAMANI, G.; TRIVEDI, M. H.; RUSH, A. J. Gender differences in depression: findings from the STAR* D study. **Journal of Affective Disorders**, v. 87, n. 2, p. 141-150, 2005.

MCNAMARA, R. K.; ABLE, J. A.; LIU, Y.; JANDACEK, R.; RIDER, T.; TSO, P.; LIPTON, J. W. Omega-3 fatty acid deficiency does not alter the effects of chronic fluoxetine treatment on central serotonin turnover or behavior in the forced swim test in female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 114, p. 1-8, 2013.

MEZADRI, T.; BATISTA, G.; PORTES, A.; MARINO-NETO, J.; LINO-DE-OLIVEIRA, C. Repeated rat-forced swim test: reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 195, n. 2, p. 200-205, 2011.

MITIC, M.; SIMIC, I.; DJORDJEVIC, J.; RADOJCIC, M. B.; ADZIC, M. Gender-specific effects of fluoxetine on hippocampal glucocorticoid receptor phosphorylation and behavior in chronically stressed rats. **Neuropharmacology**, v. 70, p. 100-111, 2013.

MITSUSHIMA, D.; YAMADA, K.; TAKASE, K.; FUNABASHI, T.; KIMURA, F. Sex differences in the basolateral amygdala: the extracellular levels of serotonin and dopamine, and their responses to restraint stress in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 11, p. 3245-3254, 2006.

MOLINA-HERNÁNDEZ, M.; TÉLLEZ-ALCÁNTARA, N. P. Antidepressant-like actions of pregnancy, and progesterone in Wistar rats forced to swim. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, n. 5, p. 479-491, 2001.

MOLINA-HERNÁNDEZ, M.; TÉLLEZ-ALCÁNTARA, N. P. Fluoxetine, 17- β estradiol or folic acid combined with intra-lateral septal infusions of neuropeptide Y produced antidepressant-like actions in ovariectomized rats forced to swim. **Peptides**, v. 32, n. 12, p. 2400-2406, 2011.

NESTLER, E. J.; GOULD, E.; MANJI, H. Preclinical models: status of basic research in depression. **Biological Psychiatry**, v. 52, n. 6, p. 503-528, 2002.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1161-1169, 2010.

NISHIZAWA, S.; BENKELFAT, C.; YOUNG, S.; LEYTON, M.; MZENGEZA, S. D.; DE MONTIGNY, C.; BLIER, P.; DIKSIC, M. Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 10, p. 5308-5313, 1997.

PAWLUSKI, J. L.; VAN DONKELAAR, E.; ABRAMS, Z.; HOUBART, V.; FILLET, M.; STEINBUSCH, H. W.; CHARLIER, T. D. Fluoxetine dose and administration method differentially affect hippocampal plasticity in adult female rats. **Neural Plasticity**, v. 2014, 2014.

PIC-TAYLOR, A.; DA MOTTA, L. G.; DE MORAIS, J. A.; JUNIOR, W. M.; SANTOS, A. D. F. A.; CAMPOS, L. A.; MORTARI, M. R.; VON ZUBEN, M. V.; CALDAS, E. D. Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) in female Wistar rats. **Behavioural Processes**, v. 118, p. 102-110, 2015.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379-391, 1978.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; BLAVET, N.; DENIEL, M.; JALFRE, M. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 57, n. 2, p. 201-210, 1979.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-732, 1977.

POSSAMAI, F.; DOS SANTOS, J.; WALBER, T.; MARCON, J. C.; DOS SANTOS, T. S.; DE OLIVEIRA, C. L. Influence of enrichment on behavioral and neurogenic effects of antidepressants in Wistar rats submitted to repeated forced swim test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 58, p. 15-21, 2015.

RAMIREZ, Steve et al. Activating positive memory engrams suppresses depression-like behaviour. **Nature**, [s.l.], v. 522, n. 7556, p.335-339, 17 jun. 2015. Nature Publishing Group.

REBOLLEDO-SOLLEIRO, D.; CRESPO-RAMÍREZ, M.; ROLDÁN-ROLDÁN, G.; HIRIART, M.; DE LA MORA, M. P. Role of thirst and visual barriers in the differential behavior displayed by streptozotocin-treated rats in the elevated plus-maze and the open field test. **Physiology & Behavior**, v. 120, p. 130-135, 2013.

RÉCAMIER-CARBALLO, S.; ESTRADA-CAMARENA, E.; REYES, R.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A. Synergistic effect of estradiol and fluoxetine in young adult and middle-aged female rats in two models of experimental depression. **Behavioural Brain Research**, v. 233, n. 2, p. 351-358, 2012.

REYNOLDS, Gavin P.; MCGOWAN, Olga O.; DALTON, Caroline F.. Pharmacogenomics in psychiatry: the relevance of receptor and transporter polymorphisms. **British Journal Of Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 77, n. 4, p.654-672, 20 mar. 2014. Wiley-Blackwell.

RUSH, A. J.; TRIVEDI, M. H.; WISNIEWSKI, S. R.; STEWART, J. W.; NIERENBERG, A. A.; THASE, M. E.; RITZ, L.; BIGGS, M. M.; WARDEN, D.; LUTHER, J. F. Bupropion-SR, sertraline, or venlafaxine-XR after failure of SSRIs for depression. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 12, p. 1231-1242, 2006.

SCHECHTER, M. D.; CHANCE, W. T. Non-specificity of "behavioral despair" as an animal model of depression. **European Journal of Pharmacology**, v. 60, n. 2, p. 139-142, 1979.

SCHUEING, Lisa et al. Antidepressant mechanism of ketamine: perspective from preclinical studies. **Frontiers in neuroscience**, v. 9, 2015.

SCHILDKRAUT, J. J.; KETY, S. S. Biogenic amines and emotion. **Science**, v. 156, n. 3771, p. 21-30, 1967.

SCHLEIMER, S. B.; JOHNSTON, G. A.; HENDERSON, J. M. Novel oral drug administration in an animal model of neuroleptic therapy. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 146, n. 2, p. 159-164, 2005.

SCHMITT, R.; GAZALLE, F. K.; LIMA, M. S. D.; CUNHA, Â.; SOUZA, J.; KAPCZINSKI, F. The efficacy of antidepressants for generalized anxiety disorder: a systematic review and meta-analysis. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 27, n. 1, p. 18-24, 2005.

SELL, S. L.; CRAFT, R. M.; SEITZ, P. K.; STUTZ, S. J.; CUNNINGHAM, K. A.; THOMAS, M. L. Estradiol-sertraline synergy in ovariectomized rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 8, p. 1051-1060, 2008.

SHAH, A.; FRAZER, A. Influence of acute or chronic administration of ovarian hormones on the effects of desipramine in the forced swim test in female rats. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 18, p. 3685-3694, 2014.

SHANNON, N. J.; GUNNET, J. W.; MOORE, K. E. A comparison of biochemical indices of 5 - hydroxytryptaminergic neuronal activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus. **Journal of neurochemistry**, v. 47, n. 3, p. 958-965, 1986.

SHELTON, R. C. Classification of antidepressants and their clinical implications. **Primary Care Companion J. Clin. Psychiatry**, v. 5, p. 27-32, 2003.

SIESSER, W. B.; SACHS, B. D.; RAMSEY, A. J.; SOTNIKOVA, T. D.; BEAULIEU, J.-M.; ZHANG, X.; CARON, M. G.; GAINETDINOV, R. R.

Chronic SSRI treatment exacerbates serotonin deficiency in humanized Tph2 mutant mice. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 84-88, 2012.

SIMPSON, J.; RYAN, C.; CURLEY, A.; MULCAIRE, J.; KELLY, J. P. Sex differences in baseline and drug-induced behavioural responses in classical behavioural tests. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 37, n. 2, p. 227-236, 2012.

SLATTERY, David A.; NEUMANN, Inga D.; CRYAN, John F. Transient inactivation of the infralimbic cortex induces antidepressant-like effects in the rat. **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, n. 10, p. 1295-1303, 2011.

SVOBODA, J.; TELENSKÝ, P.; BLAHNA, K.; BUREŠ, J.; STUCHLIK, A. Comparison of male and female rats in avoidance of a moving object: more thigmotaxis, hypolocomotion and fear-like reactions in females. **Physiological Research**, v. 61, p. 659-663, 2012.

TRIVEDI, M. H.; RUSH, A. J.; WISNIEWSKI, S. R.; NIERENBERG, A. A.; WARDEN, D.; RITZ, L.; NORQUIST, G.; HOWLAND, R. H.; LEBOWITZ, B.; MCGRATH, P. J. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. **American Journal of Psychiatry**, 2006.

ULRICH-LAI, Y. M.; OSTRANDER, M. M.; HERMAN, J. P. HPA axis dampening by limited sucrose intake: reward frequency vs. caloric consumption. **Physiology & Behavior**, v. 103, n. 1, p. 104-110, 2011.

WARNER - SCHMIDT, Jennifer L.; DUMAN, Ronald S. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. **Hippocampus**, v. 16, n. 3, p. 239-249, 2006.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, v. 134, n. 4, p. 319-329, 1997.

WONG, D. T.; HORNG, J. S.; BYMASTER, F. P.; HAUSER, K. L.; MOLLOY, B. B. A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. **Life Sciences**, v. 15, n. 3, p. 471-479, 1974.

XING, Y.; HE, J.; HOU, J.; LIN, F.; TIAN, J.; KURIHARA, H. Gender differences in CMS and the effects of antidepressant venlafaxine in rats. **Neurochemistry International**, v. 63, n. 6, p. 570-575, 2013.

ZANOVELI, J. M.; POBBE, R. L.; DE BORTOLI, V. C.; CARVALHO, M. C.; BRANDAO, M. L.; ZANGROSSI, H. Facilitation of 5-HT_{1A}-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 8, p. 1079-1088, 2010.

ZHANG, L.; MA, W.; BARKER, J.; RUBINOW, D. Sex differences in expression of serotonin receptors (subtypes 1A and 2A) in rat brain: a possible role of testosterone. **Neuroscience**, v. 94, n. 1, p. 251-259, 1999.